

Aus der Hautklinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Leitung: Prof. Dr. med. G. W. Korting)

UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN
BESTIMMUNG VON
BENZOESÄURE UND HIPPURSÄURE
IN BLUTPLASMA UND URIN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich Medizin
vorgelegt von

HOLGER SWARS
aus Trier

Mainz 1980

Aus der Hautklinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Leitung: Prof. Dr.med. G.W. Korting)

UNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON
BENZOE SäURE UND HIPPURSÄURE
IN BLUTPLASMA UND URIN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich Medizin
vorgelegt von

HOLGER SWARS
aus Trier

MAINZ 1980



Dekan: Professor Dr.med. H. Leithoff

1. Gutachter: Professor Dr.rer.nat. B. Morsches

2. Gutachter: Professor Dr. K. Bork

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 1980

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 PROBLEMSTELLUNG	1
2 EINFÜHRUNG	2
2.1 Benzoylperoxid	
2.1.1 Chemische Eigenschaften	
2.1.2 Pharmakodynamische Eigenschaften	
2.1.3 Klinische Wirkungen	
2.1.3.1 Therapie der Akne	3
2.1.3.2 Ulcustherapie und Wundheilung	
2.1.4 Nebenwirkungen	4
2.2 Benzoessäure	6
2.2.1 Hippursäurebildung	
2.2.2 Pharmakokinetik	9
2.2.3 Bildung von Benzoylglucuronid	11
2.2.4 Hippursäure - ein physiologischer Urinbestandteil	13
2.2.5 Änderungen des Benzoessäure-Metabolis- mus bei bestimmten Krankheitsbildern	14
2.2.5.1 Leberfunktionsstörungen	
2.2.5.2 Störungen des Magen-Darmtraktes	16
2.2.5.3 Psychiatrische Erkrankungen	17
2.2.5.4 Weitere Erkrankungen	18
2.2.6 Toxische Eigenschaften der Benzoessäure	19
3 EXPERIMENTELLER TEIL	21
3.1 Materialien	
3.1.1 Chemikalien	
3.1.2 Apparate	
3.1.2.1 Dünnschichtchromatographie	
3.1.2.2 Gaschromatographie	22
3.1.2.3 Säulenchromatographie	

3.2 Methodik	22
3.2.1 Dünnschichtchromatographie und spektral- densitometrisches Bestimmungsverfahren	
3.2.1.1 Extraktion von Urin bzw. Blut- plasma	
3.2.1.2 Dünnschichtchromatographische Trennung	24
3.2.1.3 Spektraldensitometrische Direkt- auswertung des Chromatogramms	25
3.2.2 Gaschromatographisches Bestimmungsver- fahren	26
3.2.2.1 Extraktion	
3.2.2.2 Gaschromatographie	
3.2.3 Säulenchromatographisch-spektralphoto- metrisches Bestimmungsverfahren	27
3.3 Arbeitsgang und Ergebnisse	30
3.3.1 Dünnschichtchromatographie und spektral- densitometrisches Bestimmungsverfahren	
3.3.1.1 Wiederauffindungsversuche bez. der Extraktion	
3.3.1.2 Dünnschichtchromatographie	31
3.3.1.3 Eichkurven	34
3.3.1.4 Wiederauffindungsversuche	37
3.3.2 Gaschromatographie	40
3.3.2.1 Extraktion	
3.3.2.2 Eichkurven	
3.3.2.3 Wiederauffindungsversuche	43
3.3.3 Säulenchromatographie und spektralphoto- metrische Auswertung	46
3.3.3.1 Eichkurven	49
3.3.3.2 Kalibrierung	
3.3.3.3 Wiederauffindungsrate für Benzoe- säure	50
3.3.3.4 Chromatogramme von mit Benzoe- säure versetztem Urin	

	Seite
4 DISKUSSION	55
5 ZUSAMMENFASSUNG	65
6 TABELLEN	66
7 LITERATURVERZEICHNIS	70

1 PROBLEMSTELLUNG

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre, betreffend das Diacylperoxid "Benzoylperoxid", befaßten sich eingehend mit den chemischen und pharmakodynamischen Eigenschaften, den therapeutischen Effekten und den toxischen Nebenwirkungen dieser Verbindung. Eine weitgehende wissenschaftliche Abklärung dieser Gesichtspunkte war die Folge.

Berichte über die Pharmakokinetik von Benzoylperoxid liegen nur spärlich vor. Jedoch kann nach den Untersuchungen von LYON (59) davon ausgegangen werden, daß lokal appliziertes Benzoylperoxid während seiner Penetration durch die Haut praktisch vollständig zu Benzoesäure metabolisiert wird. Im Blut liegt Benzoesäure in freier Form vor. Sie wird in der Leber zu mehr als 95 % mit Glycin zu Hippursäure konjugiert und als solche über die Niere ausgeschieden.

Zur Untersuchung des pharmakokinetischen Verhaltens von Benzoylperoxid ist daher die Kenntnis eines quantitativen Bestimmungsverfahrens für Benzoesäure und Hippursäure in Blutplasma und Urin Voraussetzung.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Entwicklung eines im klinisch-chemischen Routinebetrieb anwendbaren quantitativen Analyseverfahrens für Benzoesäure und Hippursäure in biologischen Flüssigkeiten (Konzentrationsbereich: 5 - 50 µg Benzoesäure/ml).

2 EINFÜHRUNG

2.1 Benzoylperoxid

2.1.1 Chemische Eigenschaften

Die chemischen Eigenschaften des Benzoylperoxids werden vor allem dadurch bestimmt, daß es als Diacylperoxid (s. Abb. 1) ein sehr starkes Oxidationsmittel darstellt, das unter thermischen und chemischen Einflüssen Radikale bildet und dabei molekularen Sauerstoff freisetzt. Daher findet es neben seiner klinischen Indikation auch vielfältige Verwendung in der Industrie, z.B. als Bleichmittel, Fixationsmittel, Polymerisationskatalysator u.a.

2.1.2 Pharmakodynamische Eigenschaften

Die pharmakodynamischen Eigenschaften des Benzoylperoxids sind noch nicht restlos abgeklärt, doch kann davon ausgegangen werden, daß sein therapeutischer Effekt vor allem auf seiner stark oxidierenden Wirkung beruht (23, 28, 29, 53, 57, 58, 65, 67, 68). Durch die Freigabe von Sauerstoff werden sauerstoffabhängige Stoffwechselreaktionen im Gewebe bzw. in der Zelle positiv beeinflusst. Gleichzeitig kommt es aber auch zu bakterio- und fungistatischen bis bakteriziden und fungiziden Effekten, die das Wachstum von anaeroben Mikroorganismen deutlich reduzieren.

2.1.3 Klinische Wirkungen

Bereits im Jahre 1905 setzte LOEVENHART (57) Benzoylperoxid vor allem wegen seiner damals schon erkannten antibakteriellen

Eigenschaften bei Verbrennungen, varikösen Ulcera und "Sycosis vulgaris" therapeutisch ein. 1965 wurde diese Substanz von PACE (67) in die Akne- und 1971 (68) in die Ulcusterapie eingeführt.

Zahlreiche Autoren bestätigten inzwischen die klinische Wirksamkeit von Benzoylperoxid sowohl für die Behandlung der Akne (8, 14, 16, 23, 29, 35, 41, 56, 61, 71, 105) wie auch für die von Ulcera unterschiedlichster Genese (13, 38, 62, 63, 65). Neuerdings wird Benzoylperoxid auch wieder zur Verbesserung der Heilungstendenz von Wunden eingesetzt (58).

2.1.3.1 Therapie der Akne

Bei der Therapie der Akne vulgaris wird auf dem eben erwähnten Wege der stark oxidierenden Wirkung des Benzoylperoxids eine drastische Abnahme der Keimzahl des in der Pathogenese der Akne bedeutsamen *Corynebakterium acnes* und damit indirekt eine Verminderung der freien Fettsäuren bewirkt (28, 29, 31, 67). Ergänzend wirkt hier ein keratolytischer und damit schädlender Effekt über eine oxidative Spaltung von Disulfid-Brücken im Keratin (8, 14, 31, 61). Auch eine sebostatische Wirkung des Benzoylperoxids, die über eine Verminderung der Talgsekretion zu einer entfettenden Wirkung auf der Haut führt, wird diskutiert (23).

2.1.3.2 Ulcusterapie und Wundheilung

Die bakteriostatische und fungistatische Wirkung von Benzoylperoxid spielt ohne Zweifel auch in der Ulcusterapie und bei der Wundheilung eine Rolle. Hiermit kann jedoch der therapeutische Effekt allein nicht erklärt werden. Er wird in besonderem Maße mit der erhöhten Sauerstoffversorgung des Gewebes

in ursächlichen Zusammenhang gebracht. Sauerstoff ist der terminale Elektronenakzeptor in der Atmungskette, wobei Sauerstoffverbrauch und die Bildung des energiereichen ATP miteinander gekoppelte Vorgänge darstellen. Im allgemeinen ist eine Zelle mit Sauerstoffmangel nicht in der Lage, die für die Zellteilung notwendige Energie aufzubringen, wie dies für die Wundheilung erforderlich ist. Wegen der unterbrochenen kapillaren Blutversorgung sind die Gewebe des Ulcusgrundes hypoxisch. Eine Behandlung mit Benzoylperoxid, das zu einer erhöhten Sauerstoffversorgung der Zelle führt, begünstigt daher die Ulcusheilung, d.h. die Granulation und Epithelisierung. Auch die Kollagensynthese ist ein wesentlicher Faktor des Heilungsprozesses (Granulationsförderung bzw. Auffüllung des Bindegewebsdefektes) bei Ulcera und Wunden. Das hierbei beteiligte Enzym "Protokollagen-Prolin-Hydroxylase" benötigt als Kofaktor molekularen Sauerstoff, wie er auch aus Benzoylperoxid freigesetzt wird (68). Die klinische Wirkung von Benzoylperoxid bei der Behandlung von Ulcera und Wunden, die sich vor allem in einer gesteigerten Granulations- und Epithelisierungstendenz äußert (13, 38, 58, 65, 68), läßt sich aufgrund der dargelegten Mechanismen zwanglos erklären. Nach HOLZMANN und MORSCHES (38) erwies sich Benzoylperoxid klinisch als ein äußerst wirksames Lokaltherapeutikum für die Behandlung von Ulcera crurum, das sich den im allgemeinen sonst verwendeten, nicht Benzoylperoxid-haltigen Spezialitäten teilweise deutlich überlegen zeigte.

2.1.4 Nebenwirkungen

In toxikologischer Hinsicht weist Benzoylperoxid keine systemische Wirkung auf (65, 67, 68). In einer ausgedehnten Studie wurde Ratten und Mäusen Benzoylperoxid über bis zu 104 Wochen peroral (~ 150 mg/kg Körpergewicht/die), subcutan (Ratten: 120 mg/die, Mäuse: 50 mg/die) und lokal (25 mg/die) appliziert.

Dabei konnte keine erhöhte Mortalitätsrate oder Tumorfrequenz festgestellt werden (88). Bei lokaler Applikation von Benzoylperoxid wird allerdings das Auftreten allergischer Hautreaktionen oder einer Dermatitis mit einer Häufigkeit von bis zu 3 % angegeben (23, 29, 56, 61, 67, 68).

2.2 Benzoessäure

Wie erwähnt, wird Benzoylperoxid während seiner Penetration durch die Haut praktisch vollständig zu Benzoessäure (s. Abb. 2) metabolisiert, die daraufhin im Blut in nicht Protein-gebundener Form vorliegt.

2.2.1 Hippursäurebildung

Bereits 1831 hatte WÖHLER in einer Ausgabe des "Berzelius's Lehrbuch der Chemie" (1831, Bd. IV, S. 376) die Vermutung ausgesprochen, daß die Benzoessäure, eine feste, in Wasser wenig lösliche, am α -C-Atom substituierte aromatische Carbonsäure ($pK_s = 4,22$), "bei der Verdauung" wahrscheinlich in Hippursäure (s. Abb. 3) umgewandelt und mit dem Urin ausgeschieden werde. Diese Vermutung wurde 1842 von KELLER (50) in Selbstversuchen weitgehend bestätigt.

Nach dem heutigen Wissensstand erfolgt die Biotransformation resorbierter Benzoessäure, die oxidativ nicht weiter abgebaut werden kann, im menschlichen Organismus nahezu ausschließlich über die Konjugation mit Glycin (1, 11, 25, 39, 54, 73, 74, 111, 120).

Dies beinhaltet folgende Stoffwechselschritte, die nach WILLIAMS (111) einheitlich für die Entgiftung aromatischer Säuren und nur für diese charakteristisch sind:

- 1) Benzoessäure + ATP $\rightarrow$ Adenylbenzoat + Pyrophosphat
- 2) Adenylbenzoat + CoA $\rightarrow$ Benzoyl-CoA + Adenylat
- 3) Benzoyl-CoA + Glycin $\rightarrow$ Hippursäure + CoA

Voraussetzung für die Bildung von Hippursäure ist also das Vorhandensein CoA-aktivierter Benzoessäure und Glycins.

Nach Studien von AMSEL und LEVY (1), QUICK (73, 74), WAN und RIEGELMAN (107) und WILLIAMS (111) findet dieser Metabolismus

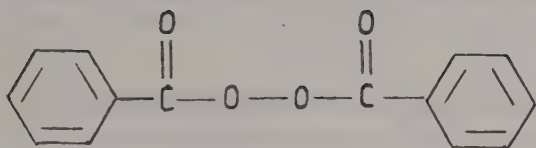


Abb. 1 Strukturformel von Benzoylperoxid

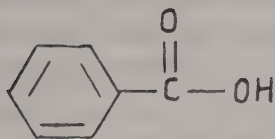


Abb. 2 Strukturformel von Benzoesäure

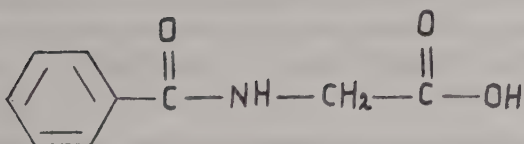


Abb. 3 Strukturformel von Hippursäure

im gesunden menschlichen Organismus zu 95 % in der Leber statt. Nur bei einem insuffizienten Leberstoffwechsel fällt gewissen extrahepatischen Geweben, wie der Niere und dem Gastrointestinaltrakt (73, 74, 107, 111) eine größere entgiftende Funktion via Enzyminduktion zu. Sie besitzen ebenfalls eine Enzymausstattung, die sie zur Bildung von Hippursäure befähigt (39).

Die prozentuale Organverteilung der Entgiftungsfunktion schwankt jedoch von Species zu Species (nach BUNGE und SCHMIEDEBERG (9) und QUICK (73, 74) ist diese Funktion beim Hund ausschließlich in der Niere lokalisiert) sehr stark. Aber auch innerhalb eines Specieskollektivs findet man erhebliche Abweichungen von der "Norm", die letztlich auch entscheidend von der Applikationsform der Benzoesäure mitbestimmt werden (107). Orale Gabe der Benzoesäure hat über eine Resorption in den portalen Kreislauf eine ungleich stärkere Belastung der Leber zur Folge, was sich im übrigen signifikant auf die Pharmakokinetik der Elimination auswirkt.

Verbindliche Aussagen sind z.Z. noch Gegenstand der Forschung. Sowohl KIELLEY und SCHNEIDER (51) als auch LEUTHARD und NIELSEN (55) konnten nachweisen, daß das für die Hippursäure-Bildung verantwortliche Enzymsystem an die Mitochondrienfraktion der betreffenden Organe gebunden ist.

SCHACHTER und TAGGART (83, 84) vermochten von aus der Leber stammenden Mitochondrien ein Enzym zu isolieren, das sie als "N-Acylase" bezeichneten. Dieses Enzym, das den Reaktionsschritt:



katalysiert, besitzt eine absolute Substratspezifität für Glycin, jedoch nur eine relative für die CoA-aktivierte Carbonsäure. Es vermag in vitro bei zahlreichen anderen aromatischen wie auch aliphatischen (2 - 10 Kohlenstoffatome)

Acyl-Thioestern von CoA die Konjugation mit Glycin zu katalysieren.

2.2.2 Pharmakokinetik

Nach Untersuchungen von AMSEL und LEVY (1), QUICK (73), WAN und RIEGELMAN (107), WU und ELLIOT (116) handelt es sich bei der Konjugation von Benzoesäure mit Glycin um eine sog. "Kapazitäts-limitierte" Reaktion. Umsatzlimitierender Faktor ist eindeutig die begrenzte Verfügbarkeit von Glycin, das sowohl aus Nahrungsstoffen resorbiert wie auch aus endogenen Vorstufen synthetisiert wird (111).

Diese Tatsache gewinnt jedoch erst nach Applikation hoher Benzoesäuremengen Relevanz und ist im Rahmen von Benzoesäurebelastungen des Organismus, hervorgerufen durch therapeutische Gabe von Benzoylperoxid, bedeutungslos.

Die Menge an Glycin, die der menschliche Organismus für die Hippursäuresynthese mobilisieren kann, beträgt ca. 9 mg/kg/h (73, 111), und der Belastungsgrenzwert an in einem gesunden Organismus vorhandener freier Benzoesäure, bis zu dem steigende Hippursäurebildungsrate beobachtet werden, beträgt ca. 2 g (1, 73, 85). Dieser Wert läßt sich durch gleichzeitige Gabe von exogenem Glycin stark erhöhen.

Nach einer oralen Belastung des Organismus mit 5 g Benzoesäure steigt die maximale Ausscheidungsrate an Hippursäure von 2,1 mg/h unter gleichzeitiger Glycin-Applikation auf 4,5 mg/h (1) an.

Die Bildung von Hippursäure ist oberhalb dieses Grenzwertes von 2 g (entspricht ca. 25 mg Benzoesäure/kg Körpergewicht) unabhängig von der applizierten Menge an Benzoesäure (7, 73), unterhalb dieses Wertes ist sie proportional der gegebenen Menge an Benzoesäure und gehorcht den Gesetzen einer Reaktion 1. Ordnung.

Es ist offensichtlich, daß der menschliche Körper eine gewisse Menge an freiem und direkt verfügbarem Glycin besitzt, welches, im Blutplasma lokalisiert, als "Initialpool" bezeichnet wird (normale Gesamt-Glycin-Konzentration im Plasma: 0,8 - 6 mg/100 ml). Dieses wird nach Benzoessäure-Belastungen für den Entgiftungsmetabolismus direkt herangezogen, so daß der Spiegel an freiem Glycin im Plasma sinkt. Erst nach Erschöpfung dieses "Initialpools", d.h. nach stärkeren Belastungen wird der sog. "Sekundärpool" für Glycin, der fast ausnahmslos aus Glycinvorstufen besteht, in Anspruch genommen (111). Benzoessäure wirkt dabei als direkter Stimulus der endogenen Glycinproduktion (73, 120), einer spezifischen Leistung der Leber.

Diese Tatsachen spiegeln sich unmittelbar an den in Hippursäure-Ausscheidungsversuchen gewonnenen Ergebnissen wider.

Die komplette Ausscheidung einer geringen Menge peroral applizierter Benzoessäure als Hippursäure beträgt 3 - 4 Stunden, die einer größeren Menge schon 10 - 14 Stunden (85). Eine Anreicherung in einzelnen Organen konnte dabei nicht festgestellt werden (40, 114).

Untersuchungen über die Penetration von C-14 markierter Benzoessäure durch die menschliche Haut ergaben, daß nach 12 Stunden ca. 36 % und nach 48 Stunden ca. 42 % der applizierten Menge im Urin wiedergefunden werden (40, 110). Nach WESTER und MAIBACH (110) ist das Ausmaß der perkutanen Resorption von der applizierten Menge an Benzoessäure abhängig. Ihre Untersuchungen zeigen eindeutig, daß Benzoessäure je nach Applikationsform und Dosis unterschiedlich schnell und in unterschiedlichem Ausmaß resorbiert werden kann.

Untersuchungen von HOLZMANN und MORSCHES (38) deuten darauf hin, daß Benzoylperoxid mit Verzögerung zu der die Haut penetrierenden Benzoessäure metabolisiert wird und somit zuerst eine Depotbildung in der Haut erfolgt, aus dem Benzoessäure mit Verzögerung freigesetzt werden kann. Hierauf weisen bei

der Behandlung von Kranken mit *Ulcera crurum* erhaltene Befunde hin, nach denen eine meßbare Konzentration von Benzoesäure im Serum frühestens am dritten Tag nach Behandlungsbeginn vorlag (38). Auch spielen hierbei sicher die infolge der im Ulcusbereich gestörten Durchblutung auftretenden veränderten Resorptions- und Transportverhältnisse eine nicht unwesentliche Rolle.

Die renale Ausscheidungsrate von Hippursäure ist nicht durch eine begrenzte Kapazität des renalen tubulären Transportsystems eingeschränkt. Sie verläuft parallel den Plasmaspiegeln von Hippursäure, so daß einer gesunden Niere keine Rolle in pharmakokinetischen Betrachtungen zukommt (1).

Bei normaler, ausgewogener Ernährung beträgt der Hippursäurespiegel des Plasmas ca. 6 - 8 µg/ml (4), und innerhalb von 24 Stunden werden ungefähr 3,8 - 4,1 mg dieser Säure pro Kilogramm Körpergewicht über die Niere ausgeschieden (48, 54).

Die durchschnittliche, täglich gebildete Menge liegt zwischen 0,1 und 1 g Hippursäure (22), was einer Ausscheidungsrate von weniger als 0,4 mg/h entspricht (1).

Die durchschnittliche Hippursäure-Urinkonzentration liegt zwischen 0,3 und 1,4 mg/ml (22), freie Benzoessäure wurde niemals als Bestandteil des Urins gesunder Menschen beobachtet (1, 21, 69).

2.2.3 Bildung von Benzoylglucuronid

Außer der Hippursäure ist ein weiterer Metabolit der Benzoesäure bekannt, das Benzoylglucuronid.

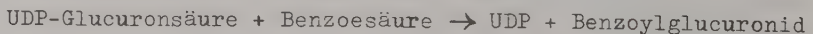
Im Urin pflanzenfressender Tiere findet sich nur Hippursäure, einige fleischfressende Lebewesen können fast die gleiche Menge beider genannten Stoffe ausscheiden (z.B. Hund, Katze).

Lebewesen, die sich von einer gemischten Kost ernähren, nehmen eine Mittelstellung ein (25, 111). Die Bildung von Benzoylglucuronid ist bei ihnen dem Plasmaspiegel von Benzoesäure direkt proportional, es handelt sich um eine Reaktionskinetik 1. Ordnung (7, 111).

Bei Gabe einer geringen Benzoesäuremenge wird im Menschen keine signifikante Glucuronidbildung beobachtet (0,2 - 0,4 %) (85), die Kapazität des Organismus, Glycin zu mobilisieren, reicht aus, den Benzoesäure-Plasmaspiegel gering zu halten. Erst nach Überschreiten der Belastungsgrenze, d.h. nach einem Gesamtgehalt von mehr als 2 g freier Benzoesäure im Organismus, steigt der prozentuale Anteil der Glucuronidierung am Entgiftungsprozeß von 0,4 auf ca. 3 % an (1, 7, 85). Gleiches gilt natürlich, wenn die Leber nur noch in einem verminderter Maße fähig ist, Glycin zu synthetisieren (120).

Bei der Konjugation von Benzoesäure mit Glucuronsäure handelt es sich also um einen alternativen Entgiftungsmechanismus, welcher allerdings erst nach verminderter Glycinproduktion oder massiver Benzoesäurevergiftung des Organismus Bedeutung gewinnt.

Die Konjugation mit Glucuronsäure ist eine spezifische Leistung der Leber und erfolgt nach der Gleichung:



Die Übertragungsreaktion wird durch eine microsomale UDP-Glucuronyl-Transferase katalysiert (85, 99, 101). Da es sich hierbei um eine Konjugation mit einer Carboxylgruppe handelt, bezeichnet man das entstehende Glycosid als "Esterglucuronid".

2.2.4 Hippursäure - ein physiologischer Urinbestandteil

Wie oben erwähnt, ist im menschlichen Stoffwechsel Hippursäure (Benzoylglycin) der Hauptmetabolit von Benzoessäure. Benzoessäure selbst gilt als Abbauprodukt von Phenylalanin, Toluol und anderen Alkylbenzolen, der größte Teil wird jedoch direkt mit der Nahrung aufgenommen (54).

In diesem Zusammenhang muß auf die Verwendung von Benzoessäure als Konservierungsstoff in Lebensmitteln und die dadurch bedingte nicht unerhebliche Resorption in den Organismus hingewiesen werden. Zudem wird eine erhöhte Hippursäure-Ausscheidung nach Aufnahme von Gemüse und Obst, speziell Preiselbeeren und Pflaumen (73), beobachtet, was auf den Abbau von Chinasäure über Benzoessäure zu Hippursäure zurückgeführt wird (22, 73).

Selbst bei einer Diät, die frei von Konservierungsstoffen, Obst und Gemüse ist, sinkt die Ausscheidung nicht auf Null, da Nahrungsmittel-Phenylalanin im Lumen des Kolon von Bakterien u.a. zu Benzoessäure abgebaut wird, welches zum Teil resorbiert und als Benzoylglycin mit dem Urin ausgeschieden wird (36, 37). Diese intestinale Bakterienflora vermag selbst aus aliphatischen Verbindungen Benzoessäure zu synthetisieren (117).

Von großer, insbesondere arbeitsmedizinischer Bedeutung ist die Rolle des oben genannten Toluols.

FLEK (26), IKEDA (42, 43), OGATA (66) und RADICS-AJTEI (78) fanden in Untersuchungen, daß bei Werktätigen, die an ihren Arbeitsplätzen giftigen Toluoldämpfen ausgesetzt waren, die Menge an ausgeschiedener Hippursäure ein Vielfaches der Norm betrug.

Steigende Belastung der Atemluft mit Toluol führt zu proportionalem Anstieg der Hippursäuresynthese, die Urinkonzentration von Hippursäure, die mit 200 p.p.m. Toluol (= maximale, noch erlaubte Konzentration) korrespondiert, beträgt schon 3,5 g/l (43).

Der Metabolismus von Toluol ist weithin bekannt. Nach Studien von SMITH, SMITHIES und WILLIAMS (94, 95) wurden bei Personen, die über 5 Stunden Toluoldämpfen einer Konzentration von ungefähr 0,3 - 1,2 mg/l ausgesetzt waren, ca. 80 % des resorbierten Toluols zu Benzoesäure oxidiert und als Hippursäure ausgeschieden, 20 % wurden in unveränderter Form über die Lungen abgeatmet.

Ähnliche Stoffwechselwege wurden auch für andere Alkylbenzole, wie Äthylbenzol, einem wichtigen Zwischenprodukt des für die Plastikherstellung benötigten Styrols, n-Propylbenzol etc., beobachtet (60, 80, 81, 93).

2.2.5 Änderungen des Benzoesäure-Metabolismus bei bestimmten Krankheitsbildern

Die im Urin und Blutplasma vorhandenen Carbonsäuren wurden bisher nur in Ausnahmefällen wissenschaftlich untersucht, obwohl die Bedeutung dieser Säuren als Indikatoren von Stoffwechsel- und Lebererkrankungen, ferner von psychiatrischen und neurologischen Krankheitsbildern möglicherweise so groß ist wie die der Aminosäuren.

2.2.5.1 Leberfunktionsstörungen

QUICK (76, 77) berichtet, daß Erkrankungen der Leber eine Einschränkung der Bildung von Hippursäure und Benzoylglucuronid zur Folge haben, wobei die Bildung von Hippursäure aber wesentlich früher beeinträchtigt sei. Mit großer Wahrscheinlichkeit bestehen bei der verminderten Bildung von Benzoylglycin Defekte sowohl in der Glycinsynthese wie auch in der Konjugation der Benzoesäure mit Glycin, wobei vieles darauf hinweist, daß die Glycinproduktion stärker beeinträchtigt ist (120).

In diesem Zusammenhang muß auch erwähnt werden, daß bis vor einigen Jahren in der medizinischen Diagnostik ein von QUICK im Jahre 1933 eingeführter Leberfunktionstest verwendet wurde, bei dem die Ausscheidung von Hippursäure nach oraler oder parenteraler Gabe von Benzoessäure gemessen wurde.

In der von VAN SUMERE (97) modifizierten Testprozedur wurden Patienten mit 50 mg/kg Körpergewicht Na-Benzoeat belastet. Daraufhin wurden bei gesunden Patienten innerhalb von 2 Stunden über 50 - 85 %, nach 4 Stunden 70 - 95 % der applizierten Menge an Benzoeat als Hippursäure ausgeschieden (da die Ausscheidungswerte stark vom Gewicht der Patienten abhängig sind, ist eine individuelle Benzoeat-Dosierung entsprechend dem Körpergewicht erforderlich).

Die bis 1969 übliche ehemalige Testprozedur bestand aus einer starren Dosierung von 6 g Benzoeat oral oder 2 g parenteral und einer einmaligen Messung der Hippursäureausscheidung nach 4 Stunden.

VAN SUMERE fand, daß bei Lebererkrankungen abgesehen von der schon bekannten verminderten 4-Std.-Hippursäurebildungsrate ein beträchtlicher Teil der Hippursäure in der 2. - 4. Stunde gebildet wird (bei gesunden Individuen findet die Synthese der Hauptmenge in den ersten beiden Stunden statt), so daß bei der Beurteilung der Entgiftungsfunktion der Leber auch der Pharmakokinetik eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Deutlich verminderte 2-Std.-Ausscheidungswerte (Verminderung auf 6 - 40 %) finden sich bei Patienten mit Hepatitis, Leberzirrhose, Leberstauung und Leberkarzinom. Bei diesen Lebererkrankungen beobachtet man eine gute Korrelation zwischen Ausmaß des Leberschadens und Verminderung der Ausscheidung an Hippursäure, ferner einen starken Anstieg der Bildung von Benzoylglucuronid (102, 116, 119, 120).

Aufgrund der Aufwendigkeit dieses Tests, der Komplexität der quantitativen Hippursäurebestimmung, der geringer differential-

diagnostischen Aussagekraft und der Abhängigkeit von anderen Faktoren (verminderte Ausscheidungsraten fand man ferner bei Nierenschäden (90), Hyperthyreoidismus, Diabetes mellitus und Pancreaskopfkarzinom), wurde dieser Test aufgegeben.

2.2.5.2 Störungen des Magen-Darmtraktes

In der Literatur schenkte man bisher Zusammenhängen zwischen der Benzoesäure und dem bakteriellen Metabolismus von Phenylalanin geringe Beachtung. Nur YOUNG (117) deutete auf solche Zusammenhänge hin.

Wie schon oben angedeutet, entsteht im menschlichen Organismus Benzoesäure physiologischerweise durch bakteriellen Abbau von Phenylalanin, das in großer Menge aufgenommen und nicht vollständig im Intestinum resorbiert wird, so daß ein Teil mit der Bakterienflora des Kolons in Berührung kommt. Weiteres Phenylalanin erreicht das Kolon in Form von Proteinen gastrointestinaler Sekrete und abgeschilfter Mucosazellen. In diesem Sinne sind die Veröffentlichungen von VAN DER HEIDEN (36, 37) zu verstehen.

Er stellte bei Patienten, die mit cystischer Pankreasfibrose oder Kolonerkrankungen, Resektion des Dünndarms oder unklassifizierbarer Enteritis belastet waren, hohe Ausscheidungswerte unkonjugierter Benzoesäure in Urin und Faeces fest. Dies deutet auf eine stark eingeschränkte Verwertungsstörung phenylalaninhaltiger Proteine und verminderte Resorption von Phenylalanin im Intestinum hin, was zu einem massiven bakteriellen Abbau im Kolon und einer unphysiologisch hohen Belastung des Organismus mit resorbierter Benzoesäure führt. Die Ausscheidungswerte von Hippursäure und Benzoylglucuronid sind selbstverständlich ebenfalls stark erhöht.

Erwähnenswert ist ferner die Tatsache, daß bei Patienten, die an einem Carcinoid leiden, die physiologische Hippursäureaus-

scheidung um das 10-fache reduziert ist (112). Dies mag entweder Ausdruck einer ausgeprägten Metastasierung in die Leber oder der Tatsache sein, daß nur ein verschwindend kleiner Teil der im Intestinum vorhandenen Benzoessäure die Leber zur Entgiftung erreicht.

2.2.5.3 Psychiatrische Erkrankungen

Schon seit einigen Jahrzehnten ist die interessante Tatsache bekannt, daß viele chronisch schizophrene Patienten, insbesondere kataton Schizophrene, nach Belastung mit Na-Benzolat signifikant weniger Hippursäure ausscheiden als gesunde Kontrollpersonen.

PERRY (69) entdeckte 1970 bei einer Anzahl kataton Schizophrener ohne vorhergehende Benzoatbelastung der Patienten große Mengen freier Benzoessäure und eine entsprechend reduzierte Menge an Hippursäure im Urin. Diese Auffälligkeiten beobachtete man jedoch nur bei denjenigen Patienten, die im Augenblick der Untersuchung an akuten Schüben ihrer Krankheit litten. Die Stoffwechselanomalien verschwanden nach dem Abklingen der akuten Symptomatik. Die Patienten waren organisch gesund und unterlagen keiner Psychopharmaka-Medikation. Diese Beobachtungen wurden 1971 von JELLUM (47) bestätigt, der allerdings analoge Beobachtungen an 12 geistig unspezifisch retardierten Patienten machte.

Bisher ist noch unbekannt, ob es sich bei diesen Erscheinungen um Folgen eines Stoffwechseldefektes (Beeinträchtigung der N-Acylase?), einer Inhibition des letztgenannten Enzyms oder einfach um eine Normvariante handelt.

Das Vorhandensein unkonjugierter Benzoessäure im Organismus dieser Kranken könnte auf eine unzureichende hepatische Konjugation neurotoxischer Stoffe mit Glycin hinweisen.

Eine Hypersekretion von Hippursäure wurde in Fällen von sog.

"frei flottierender Angst" beobachtet. Dieser Zustand kann sich unter Umständen bei Menschen entwickeln, die lange Zeit akuten realen Angstzuständen (z.B. Krieg) ausgesetzt waren. Die somatischen Zeichen dieser Angstzustände entwickeln sich bei diesen Patienten nach Rückgang des realen Stressses nicht zurück. Nach Psychotherapie normalisierte sich jedoch die Hippursäureausscheidung (22, 70).

Den Anstieg der Hippursäurebildung führt man auf eine erhöhte Kapazität der Leber zur Glycinkonjugation zurück, die unter Umständen eine physiologische Antwort auf die angstausslösende Situation generell darstellt.

2.2.5.4 Weitere Erkrankungen

2.2.5.4.1 Bei den im Rahmen der Phenylketonurie stark erhöhten Phenylalaninspiegeln im Blut kommt es aufgrund einer Rückdiffusion dieser Aminosäure in das Kolon zu einem bakteriellen Metabolismus. Die dadurch induzierte Benzoesäureentstehung hat eine vermehrte Hippursäureausscheidung des Organismus zur Folge (6, 106).

2.2.5.4.2 Von besonderem biochemischem Interesse sind die Erkenntnisse von BEARDMORE (5) und JOLLEY (48), die bei Patienten mit einem Lesch-Nyhan-Syndrom exzessiv erhöhte Ausscheidungswerte an freier und mit Glucuronsäure konjugierter Benzoesäure, dagegen eine verminderte Hippursäureausscheidung fanden. Dies deutet auf eine massive Störung der hepatischen Glycinkonjugation hin.

2.2.5.4.3 Stark verminderte Ausscheidungswerte an Hippursäure findet man ferner bei akuter lymphatischer Leukämie (48, 86) und Isovaleryl-Acidämie (2). Bei der letztgenannten Erkrankung

werden sämtliche Glycin-Reserven für die Konjugation mit Isovaleryl-CoA mobilisiert.

2.2.6 Toxische Eigenschaften der Benzoesäure

Was nun die Toxikologie der Benzoesäure selbst betrifft, so wurde für Ratten, die hinsichtlich des Benzoesäurestoffwechsels dem Menschen sehr ähnliche Verhältnisse aufweisen, bei oraler Applikation eine LD_{50} von 2700 mg/kg Körpergewicht und bei i.v.-Applikation eine LD_{50} von 1714 ± 124 mg/kg Körpergewicht nachgewiesen. Zahlreiche Kurz- und Langzeitstudien an Ratten haben weiterhin gezeigt, daß bei einer Diät mit bis zu 1 % Benzoesäure, entsprechend 500 mg/kg Körpergewicht, niemals toxische Nebenwirkungen auftraten (114). Schon eine Erhöhung der Benzoesäurebelastung des Futters auf 2 % bedingt ein reduziertes Größenwachstum der Ratten und eine Letalität von 50 % innerhalb von 4 Wochen. Eine Benzoesäure-Anreicherung auf 2,5 % ist bereits hochtoxisch und hat ein Absterben des gesamten Rattenkollektivs in weniger als einer Woche zur Folge (108). Sehr interessant ist die Beobachtung von WEBB und SHAH, wonach eine Applikation von Folsäure oder Vit B_{12} neben einer Benzoesäurebelastung, die unterhalb des toxischen Bereiches liegt (z.B. 1 % der Diät), die Menge an Benzoesäure, die in einer bestimmten Zeiteinheit als Hippursäure ausgeschieden wird, zwar stark erhöht (um bis zu 20 %), die Toxizität der Benzoesäure aber hierdurch nicht im geringsten beeinflusst (33, 108).

Nebenwirkungen beim Menschen, allerdings bei recht unterschiedlichen Dosen, sind nach oraler Benzoesäure-Gabe vor allem in Form von gastrointestinalen und zentralnervösen Störungen bekannt geworden. Durch lokale Irritation der gastrointestinalen Mucosa kommt es zu Erscheinungen wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe und Anorexie, die zentralnervösen Symptome zeigen sich in Form von Schwindel, reflektorischem Erbrechen und Kopfschmerzen (38, 50, 73).

Ernstere Symptome, wie Konvulsionen und respiratorische Insuffizienz, wurden bisher nur bei Tieren beobachtet.

Akute Vergiftungserscheinungen sind jedoch reversibel und beruhen eher auf Veränderungen im Säuren-Basen-Haushalt als irgendeiner Organschädigung (114).

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, daß etwa 2 g Benzoesäure/die von Menschen ohne Nebenwirkungen auch über längere Zeit toleriert werden.

Bei mit Benzoylperoxid-haltigen Lokaltherapeutika behandelten Patienten ergab sich ein maximaler Plasmaspiegel der Benzoesäure von $5 \mu\text{mol/l} \hat{=} 610 \mu\text{g/l}$ (38). Diese Konzentration liegt noch weit unter der sonst für den Menschen als tolerierbar angegebenen Dosis und schließt eine toxische Nebenwirkung dieses Medikaments infolge Resorption auch nach Applikation größerer Mengen praktisch aus.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Ameisensäure; Ameisensäure-Äthylester (98 - 100 %, kristallisierbar); Athanol; Äther; Benzoesäure (krist.); Carboxyl-¹⁴C-Benzoesäure (American Bussler, Braunschweig); Benzoylperoxid (70 %, Stiefel-Laboratorium GmbH); Chloroform; Di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat; Essigsäure-Äthylester; Hippursäure (krist.); Kaliumdihydrogenphosphat; Kreatinin; Methanol; Natriumchlorid; Natriumhydroxid; Natriumnitrat (wasserfrei); Salzsäure (rauchend, min. 37 %); Toluol.

Alle genannten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad "p.A." und wurden bis auf das Benzoylperoxid und die radioaktiv markierte Benzoesäure von der Firma E. Merck AG, Darmstadt, FRG, bezogen.

3.1.2 Apparate

3.1.2.1 Dünnschichtchromatographie

DC-Festfolienplatten SIL G-25 UV₂₅₄; 20 x 20 cm; Schicht: 0,25 mm
Kieselgel mit Fluoreszenz-Indikator UV₂₅₄ (Macherey-Nagel & Co.);
Spektrophotometer, Model SL 3000, und UIC 300 Locality Counter
(Schöffel Instrument-Corp., Westwood, N.J., USA)
Liquid Distillation Spectrometer, SL 30 (Intertechnique)
Rotationsverdampfer (Jacke u. Kunzel KG, IKA-Werk) Typ RV 35
Kieselgel G nach Stahl - (für die Dünnschichtchromatographie)
(Merck)

3.1.2.2 Gaschromatographie

Packard-Gaschromatograph, Model 428; Detector: FID

Glassäule (Länge: 3,4 m, Durchmesser: 2 mm)

Trärgas: Stickstoff

Säulenpackung: 1) SE 30 (WGA Düsseldorf)

2) 1% Silikon OV 210 + 1,8% Silikon OV 225

auf Chromosorb WHP 80-100 mesh (WGA Düsseldorf)

MSTFA (= N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluor-acetamid) zur
Silylierung gaschromatographisch zu bestimmender Substanzen
(Macherey-Nagel & Co.)

Hamiltonsche Mikroinjektionsspritze (S.G.E.)

3.1.2.3 Säulenchromatographie

Glassäulen für die Säulenchromatographie (100 x 1 cm)

Säule packung: Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemicals)

Particle size: 40-120 u

Magnetrührer IKA-Combimag RCT (IKA-Werk).

Radi Rac[®]-Fraction collector (Rotator, Typ 3401 B

Distributor, Typ 3402 B

Controller, Typ 3403 B

Siphon stand, Typ 3404 B) (LKB)

Registrierendes Spektralphotometer DMR (Zeiss)

3.2 Methodik

3.2.1 Dünnschichtchromatographie und spektraldensitometrisches Bestimmungsverfahren

3.2.1.1 Extraktion von Urin bzw. Blutplasma

2 ml menschlicher Urin bzw. menschliches Blutplasma werden in

ein kleines O-Röhrchen (es handelt sich hierbei um kleine Reagenzgläser, die am unteren Ende konisch zulaufen und mit Schliffstopfen versehen sind) pipettiert. Es folgt die Zugabe von 4 ml gesättigter NaCl-Lösung und 4 Tropfen 6 n HCl. Nach gutem Durchmischen des Inhaltes werden 5 ml Essigsäure-Äthylester dem Röhrcheninhalt zugesetzt. Schwache Säuren, wie die Benzoessäure oder Hippursäure, liegen bei dem niedrigen pH-Wert der wässrigen Phase in weitgehend undissoziierter Form vor und reichern sich als lipophile Substanzen in der organischen Phase an.

In einem weiteren Arbeitsschritt wird das O-Röhrchen für ca. 30 Sekunden durchgeschüttelt und zentrifugiert, bis sich wiederum 2 Phasen, die bei der Plasmaprobe durch eine ausgefällte Proteinschicht getrennt sind, ausgebildet haben.

Die obere Essigsäure-Äthylester-Phase wird abpipettiert und in ein großes O-Röhrchen gegeben. Dieser Arbeitsgang des Ausschüttelns wird noch zweimal mit je 5 ml Essigsäure-Äthylester und dreimal mit je 5 ml Äther wiederholt.

Dem im großen O-Röhrchen vereinigten Essigsäure-Äthylester/Äther-Extrakt (je ca. 15 ml) wird zum Trocknen schrittweise 6 g wasserfreies Natriumsulfat (Na_2SO_4) zugesetzt und das resultierende Gemisch leicht geschüttelt. Das Extrakt wird in den Rundkolben eines Rotationsverdampfers abfiltriert (vorher Filterpapier mit Essigsäure-Äthylester angefeuchtet), großes O-Röhrchen und Filter werden anschließend mit 10 ml Essigsäure-Äthylester gespült.

Das Essigsäure-Äthylester/Äther-Gemisch wird nun im Rotationsverdampfer abgedampft.

Das Urin-Extrakt wird in 2 ml Methanol aufgenommen, 1 ml dieser Lösung, entsprechend 1 ml Urin in ein kleines O-Röhrchen pipettiert und unter einem Stickstoffstrom eingedampft.

Das Serum-Extrakt wird dagegen zunächst zur Entfettung in

einem Methanol/Aqua bidest. Gemisch (7 : 3 v/v) von 10 ml gelöst, in ein großes O-Röhrchen pipettiert, mit einer Spatelspitze grobem Kieselgel nach Stahl versetzt und für 30 Sekunden gut durchgeschüttelt. Das Röhrchen wird mit einem Stopfen verschlossen und über Nacht bei -20°C . gelagert. Daraufhin wird das Gemisch für 5 Minuten bei 4000 Upm. zentrifugiert und 5 ml des Methanol/ H_2O -Gemisches in ein kleines O-Röhrchen pipettiert.

Dieses Gemisch, das nun unter einem Stickstoffstrom eingedampft wird, entspricht 1 ml Serum.

3.2.1.2 Dünnschichtchromatographische Trennung

Für die dünnschichtchromatographische Trennung werden DC-Fertigplatten SIL G-25 UV₂₅₄ verwendet. Im Verlaufe der Experimente stellte sich heraus, daß durch eine ca. 1-stündige Aktivierung der Platten im Trockenschrank bei 100°C . bessere Resultate erzielt werden können.

Es werden 1 cm breite Bahnen in das Kieselgel der Platte eingeritzt und das im kleinen O-Röhrchen befindliche Urin- bzw. Plasmaextrakt in 0,2 ml Äthanol gelöst.

Daraufhin wird diese äthanolische Lösung mit einer Mikropipette unter dem ständigen kalten Luftstrom eines Föns auf einer der 1 cm breiten Bahnen in einer vom unteren Rand der Platte gemessenen Höhe von 3,5 cm aufgetragen. Eine im direkten Anschluß an diese Bahn befindliche 1 cm breite 2. Bahn bleibt, da sie als Leerbahn (= Leerwert) der folgenden spektraldensitometrischen Direktauswertung fungiert, frei.

Die Entwicklung des Chromatogrammes gliedert sich in zwei Abschnitte:

a) Nach gutem Eintrocknen des Extraktes in das Kieselgel läßt man es im Fließmittel Methanol 0,5 cm, d.h. auf eine Höhe von 4 cm, anlaufen. Die Auftraghöhe von 3,5 cm und diese Vorbehandlung mit Methanol haben sich im Verlaufe von Versuchsreihen

als Bedingung für die einwandfreie Entwicklung der Chromatogramme herausgestellt.

b) Nach dem Trocknen im Kaltluftstrom eines Föns erfolgt die endgültige aufsteigende eindimensionale Dünnschichtchromatographie bei Kammersättigung im Fließmittel Toluol-Ameisensäure-äthylester-Ameisensäure (5 : 4 : 1 v/v). Zur Kammersättigung wird in die Entwicklungskammer ein Filterpapierbogen eingespannt.

Nach aufsteigender Entwicklung bis auf eine Höhe der Lösungsmittelfront von 19 cm (d.h. Entwicklungsstrecke der Chromatographie = 15 cm) wird die Platte zunächst für 5 Minuten in Luft angetrocknet, daraufhin erfolgt mit einem Fön die Resttrocknung.

Da die Lösungsmittel in der Kammer in unterschiedlichem Maße flüchtig sind, muß das Fließmittel täglich erneuert werden.

3.2.1.3 Spektraldensitometrische Direktauswertung des Chromatogramms

Die Densitometrie der getrockneten Platte wird im Spektraldensitometer SD 3000 durchgeführt, das mit einer Xenon-Quecksilberlampe, einem Gittermonochromator und Absorptionsdetektor ausgerüstet ist und eine Absorptionsmessung im Zweistrahl-Durchlichtverfahren bei einer Spaltbreite von 10 x 1 mm erlaubt.

Die Messung der Absorptionskurven chromatographierter Benzoes- bzw. Hippursäure ergaben im Transmissions- (= Durchlicht-) verfahren für Benzoesäure ein Absorptionsmaximum bei 244 nm, für Hippursäure ein Maximum bei 256 nm.

Die Geräteempfindlichkeit wird auf 40 % der Vollempfindlichkeit des Gerätes eingestellt, die Papiervorschubgeschwindigkeit beträgt 4 in./min.

Die eigentliche Messung erfolgt im Doppelstrahlverfahren, bei

der der Referenzstrahl eine der Probenbahn entsprechende Leerbahn durchläuft und somit Schwankungen des Backgrounds aufgrund unterschiedlicher Schichtdicke des Sorptionsmittels kompensiert.

3.2.2 Gaschromatographisches Bestimmungsverfahren

3.2.2.1 Die Extraktion von Urin und Blutplasma verläuft analog dem oben beschriebenen Verfahren.

3.2.2.2 Gaschromatographie

Verwendet wird ein Packard-Gaschromatograph, Model 428. Als Packung der Glassäule (Länge: 3,4 m, innerer Durchmesser: 2 mm) wird 1 % Silikon OV 21C + 1,8 % Silikon OV 225 auf Chromosorb WHP 80 - 100 mesh verwendet.

Der Detektor ist ein Flammen-Ionisations-Detektor (FID), als Trägergas dient Stickstoff mit einem Gasdurchfluß von 0,2 ml/sec. (= 12 ml/min.), die Hilfsgase sind Sauerstoff und Wasserstoff.

Temperaturen: Oven limit: 330° C, Detector temp.: 100° C, Injection temp.: 100° C, Initial temp.: 100° C, Final temp.: 100° C, Rise/min.: 10° C.

Die Arbeitstemperatur wie auch die Temperatur des Einspritzraums und Detektors betragen somit 100° C.

Nach der Extraktion wird der Urin- bzw. Plasmarückstand zur Silylierung mit 100 µl MSTFA (= N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluor-acetamid) versetzt, das Röhrchen mit einem Stopfen fest verschlossen und zur vollständigen Auflösung des Rückstandes leicht geschüttelt. Das O-Röhrchen mit dem Reaktionsgemisch wird nun über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen (Mindesttemperatur: 15 - 20° C, Mindesteinwirkdauer: 12 Stunden).

Schließlich wird ein Volumen von 1 μ l der Probenlösung mit Hilfe einer Hamiltonschen Mikroinjektionsspritze (S.G.E.) eingespritzt.

Die Chromatogramme werden bei 25 % ($\hat{=}$ V_4) der Vollempfindlichkeit des Gerätes durchgeführt, die Papiervorschubgeschwindigkeit des Schreibers beträgt 1 cm/min.

3.2.3 Säulenchromatographisch-spektralphotometrisches Bestimmungsverfahren

Für die Auftrennung von Benzoesäure und Hippursäure findet eine Dextran-Gel-Säule (Sephadex G-10, 90 x 1 cm) Verwendung.

Vor dem Gießen der Säule wird das Dextran-Gel (benötigte Menge ca. 100 ml) 4 - 5 mal mit destilliertem Wasser in einem Becherglas gewaschen. Die feinen, im Überstand schwebenden Partikel werden jeweils dekantiert.

Daraufhin wird als Elutionsmittel ein Phosphatpuffer angesetzt. Eine 0,1 molare KH_2PO_4 -Lösung (13,61 g/l H_2O) und eine 0,1 molare Na_2HPO_4 -Lösung (14,2 g/l H_2O) werden im Verhältnis $\text{Na}_2\text{HPO}_4 : \text{KH}_2\text{PO}_4 = 61,2 : 38,8$ (v/v) gemischt. so daß der pH-Wert dieses 0,1 molaren Puffers 7 beträgt.

Das Dextran-Gel wird mit Puffersubstanz äquilibriert und die zur Elution benötigte Pufferlösung sowie das Gel in je zwei Erlenmeyer-Kolben überführt. Die Kolben sind mit Schliffstopfen verschlossen, die je eine Bohrung für einen Glasrohr-Aufsatz besitzen. Die Glasrohre werden mittels eines starren Gummischlauches mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden, und unter Unterdruck werden die Puffersubstanz bzw. das in Pufferlösung äquilibrierte Gel mit Hilfe eines Magretrührers für ca. 4 Stunden "entgast".

Diese Maßnahme des "Entgasens" soll vor der vorzeitigen bakteriellen Besiedlung des Gels schützen. Aus gleichem Grunde

empfiehlt es sich, die weiteren Arbeitsschritte in einem Kühlraum zu unternehmen.

Das Gießen der 90 cm hohen Gel-Säule geschieht in folgender Weise: Der Auslauf der Glassäule (100 x 1 cm) wird zunächst mit Glaswolle verstopft und an einen mit einer Schlauchklemme verschlossenen Gummischlauch angeschlossen. Daraufhin wird die Säule mit Pufferlösung gefüllt und kontinuierlich aufgeschlämmtes Gel hinzugegeben, währenddessen Pufferlösung über den kapillären Auslauf abläuft.

Nach Fertigstellung der 90 cm hohen Säule werden mittels einer Auslaufpipette 1 ml eines mit Pufferlösung im Vol.-Verhältnis 1 : 1 verdünnten Urins bzw. Blutplasma auf das Gel aufgegeben.

Die Glassäule wird mit einem von einem Glasröhrchen durchbohrten Gummistopfen verschlossen und mit einem Vorratsgefäß an Elutionsmittel verbunden, währenddessen der Auslauf an einen Fraktionssammler angeschlossen wird (Versuchsanordnung s. Abb. 4).

Der Siphon des Fraktionssammlers fraktioniert das Elutionsvolumen in Mengen à 2,2 ml in kleine Reagenzgläser, die auf der Trägerplatte eines Rotators aufgesteckt sind. Nach der fraktionierten Auffüllung von 80 Reagenzgläsern (Elutionsvolumen ca. 180 ml) wird das System durch Zudrehen der Schlauchklemmen unterbrochen.

In einem letzten Arbeitsschritt wird die Extinktion eines jeden eluierten und fraktionierten Einzelvolumens mittels eines "Registrierenden Spektralphotometers DMR 10" im Doppelstrahlverfahren bei einer Bandbreite der Apparatur von $k = 1$ gemessen.

Verwendet werden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von $d = 1$ cm, als Referenzsubstanz der Leerwert-Küvette dient Pufferlösung.

Die Meßwellenlänge beträgt $\lambda = 225$ nm (in Vorversuchen beim Erstellen einer Absorptionskurve als Absorptionsmaximum von in Pufferlösung gelöster Benzoesäure ermittelt (s. Abb. 19).

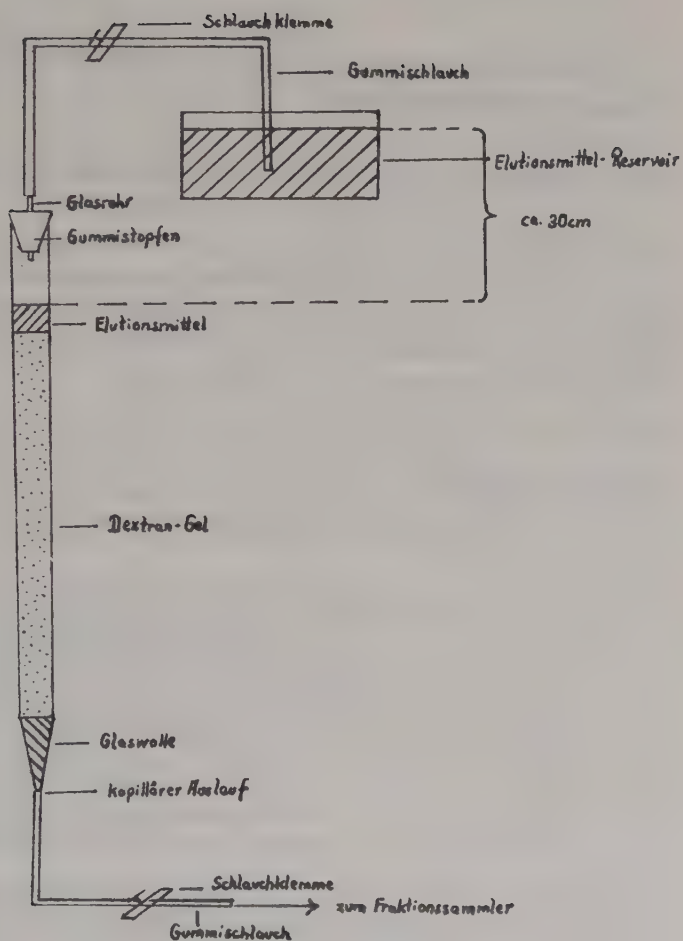


Abb. 4 Schematische Darstellung der säulenchromatographischen Versuchsanordnung

3.3 Arbeitsgang und Ergebnisse

3.3.1 Dünnschichtchromatographie und spektraldensitometrisches Bestimmungsverfahren

3.3.1.1 Wiederauffindungsversuche bezüglich der Extraktion

Grundlage des Extraktionsverfahrens, wie es auch hier angewendet wurde (s. 3.2.1.1), bilden Untersuchungen von BLAU (6), COWARD und SMITH (15), DAGLIESH und HORNING (18), HAMMOND und GOODMAN (34), VAN DER HEIDEN (36), JAAKONMAKI und HORNING (44), TEUCHY und VAN SUMERE (100) und WU (115).

Insbesondere DALGLIESH (18), HAMMOND (34) und JAAKONMAKI (44) erzielten in ihren kombinierten Essigsäure-Äthylester/Äther-Elutionsverfahren für in Urin gelöste saure oder neutrale aromatische Verbindungen gut reproduzierbare Ergebnisse mit hoher Wiederfindungsrate.

Im Rahmen der Ermittlung der Wiederfindungsrate des Extraktionsverfahrens wurden 10 Urin- und 10 Plasmaproben (2 ml) mit je 0,01 μ Ci radioaktiv markierter Benzoesäure (Carboxyl- ^{14}C -Benzoesäure) versetzt und extrahiert. Die Rückstände, ferner 4 sog. 100 %-Proben wie auch 4 Leerwerte wurden mit je 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve 1, 9927 k) versetzt und die "Counts" pro Minute (cpm) mittels eines "Liquid Szintillation Spectrometer" in je 10-minütigen Zeiteinheiten gemessen.

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate der Urinproben lag bei 94 %, die der Plasmaproben bei 68 % (s. Tab. 1).

Dabei ist es sehr wahrscheinlich, daß bei den Plasmaproben ein großer Teil der lipophilen Benzoesäure bei der Entfettung des Extraktes verlorenging.

3.3.1.2 Dünnschichtchromatographie

Ausgehend von den Versuchen von H. TEUCHY und C.F. VAN SUMERE (100), die eine dünnschichtchromatographische Arbeitsmethode zur quantitativen Bestimmung von Hippursäure im Urin von Ratten entwickelten, wurden sämtliche 11 von ihnen zur chromatographischen Darstellung von Hippursäure angeführten Fließmittel auf ihre Anwendbarkeit auf DC-Fertigplatten SIL G-25 UV₂₅₄ und ihre Trenneigenschaften bezüglich Hippursäure, Benzoesäure und Benzoylperoxid in menschlichem Urin überprüft.

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt die folgende Zusammenstellung:

Fließmittel	Trenneigenschaften
1. n-Butanol-Essigsäure-Wasser (4/1/5)	-
2. Essigsäure (2 %)	-
3. Äthanol (94 %)	-
4. Chloroform-Essigsäure-Wasser (4/1/1)	-
5. Toluol-Ameisensäureäthylester (2/10)	-
6. Toluol-Ameisensäureäthylester-Ameisensäure (5/6/7)	-
7. sek. Butanol-Wasser (4/1)	+
8. Benzol-Essigsäure-Wasser (125/72/3)	+
9. Toluol-Ameisensäureäthylester-Wasser (2/10/1)	+
10. Toluol-Ameisensäureäthylester-Ameisensäure (5/4/1)	+++
11. Toluol-Ameisensäureäthylester-Ameisensäure (10/4/1)	++

Optimale Trenneigenschaften auf SIL-G Platten zeigten somit die Fließmittel 10) Toluol-Ameisensäureäthylester-Ameisensäure (5 : 4 : 1) und 11) Toluol-Ameisensäureäthylester-Ameisensäure (10 : 4 : 1).

Sämtliche im Urin vorhandenen und im unteren UV-Bereich absorbierenden Substanzen, wie auch Benzoesäure und Benzoylperoxid waren klar voneinander abgesetzt und bildeten engbegrenzte Absorptionsbanden.

Dazu liegt die Fließdauer für eine Strecke von 20 cm mit 2 Stunden für das 10. Fließmittel relativ niedrig.

Im Hinblick auf die spätere densitometrische Auswertung und das damit verbundene Auftragen des gesamten Extraktes auf nur 1 cm breite Bahnen zeigte sich, daß im Falle einer niedrigen Auftragungshöhe (unter 3,5 cm) die hohe Anlaufgeschwindigkeit des Fließmittels zu wenig Zeit für den Lösungsprozeß der Substanzen beläßt, so daß z.B. ein Teil der Hippursäure erst in Lösung geht, wenn ein anderer Teil schon eine Strecke mit dem Fließmittel transportiert wurde.

Verwaschene, sich überlagernde Banden und sog. "Schwanzbildungen" waren die Folge.

Von Vorteil erwies sich in diesem Zusammenhang ein Vorlaufen mit dem Fließmittel Methanol von einer Auftragungshöhe von 3,5 cm bis zu einer Höhe von 4 cm im Sinne einer Sammlung des Extraktes zu einer eng begrenzten Startbande. Engere Banden und eine exaktere Bestimmung der R_f -Werte sind die Folge.

Anhand des Vergleichs von in speziellen Bahnen als "Referenzsubstanzen" aufgetragener Mengen an reiner Benzoesäure und Hippursäure mit extrahiertem und mit Benzoesäure versetztem Urin bzw. Blutplasma zeigte sich unter einer UV-Lampe, daß beide Verbindungen deutlich von anderen im unteren UV-Bereich absorbierenden Urin- bzw. Plasmasubstanzen abgetrennt, d.h. in reiner Form dargestellt werden.

Exakt das gleiche gilt für Benzoylperoxid, doch war es unmöglich, diese lipophile Verbindung in Urin bzw. Plasma zu lösen. Nach Lösen in Essigsäureäthylester, Auftragen einer gewissen Menge auf die Platte, Entwicklung des Chromatogrammes und Vergleich mit dem entwickelten Chromatogramm eines Urinextraktes sah man, daß im Falle einer wässrigen Lösung dieser Substanz Benzoylperoxid gleichfalls in reiner Form dargestellt würde.

Die R_f -Werte für Benzoesäure und Hippursäure betragen 0,66 bzw. 0,46 (s. Tab. 2), der von Benzoylperoxid 0,84.

Die Entwicklung des Chromatogramms bis zu einer Platten-Gesamthöhe von 19 cm ist für die Auswertung von Vorteil (bessere Aufschlüsselung der im Urin vorhandenen Substanzen, nur geringe Verbreiterung der einzelnen Absorptionsbanden).

Zur endgültigen Abklärung der Frage, ob es sich bei der Substanz mit dem R_f -Wert von 0,66 tatsächlich um Benzoesäure handelte, wurde die Plattenbeschichtung, die diese Absorptionsbande enthielt, unter einer UV-Lampe vorsichtig abgekratzt und in ein Reagenzglas überführt. Das Betrachten der Platte unter kurzwelligem UV-Licht ist die einfachste und empfindlichste Methode zum Auffinden der in diesem Wellenlängenbereich dunkel fluoreszierenden Substanzen und jeder Farbreaktion deutlich überlegen.

Zu dem im Reagenzglas befindlichen Schichtmaterial wurden 6 ml Chloroform gegeben und aufgeschlämmt. Diese Suspension wurde für ungefähr 2 Stunden in ein Wasserbad von 40° C gestellt, in ein 2. Reagenzglas abfiltriert und der Kieselgel-Rückstand mit jeweils 2 x 3 ml Chloroform gewaschen. Das Chloroform wurde schließlich unter einem Luftstrom eingedampft, der Rückstand für die Gaschromatographie aufgearbeitet und gaschromatographisch untersucht (s. Versuchsbeschreibung oben).

Auf diese Weise konnte festgestellt werden, daß es sich bei der vom Trägermaterial eluierten Substanz eindeutig und nur um Benzoesäure handelte.

Polyamid als Trägermaterial zeigte im Gegensatz zum verwendeten Silica-Gel unzureichende Trenntendenzen. Es kam zum häufigen Auftreten von Schwänzen und Streifen auf den Chromatogrammen, zudem war die Kapazität der verwendeten Platten (Schleicher u. Schüll & Co.) zu gering, um das gesamte extrahierte Material aufzunehmen.

3.3.1.3 Eichkurven

Benzoessäure: Ausgehend von einer äthanolischen Benzoessäure-Stammlösung von 50 µg/ml wurde je 1 ml folgender Standard-Verdünnungsreihe auf je eine 1 cm breite Bahn einer präparierten Silica G-Platte aufgetragen: 5 µg/ml; 10 µg/ml; 15 µg/ml; 20 µg/ml; 25 µg/ml; 30 µg/ml; 35 µg/ml; 40 µg/ml und 50 µg/ml. Nach Entwicklung des Chromatogramms folgte die spektraldensitometrische Messung bei einer Wellenlänge von 244 nm (s. Abb. 5) und die Auswertung der Peaks nach der Formel: Peakhöhe x Halbwertsbreite ($h \times b_{1/2 h}$).

Die Eichkurve (s. Abb. 7) zeigt für den Konzentrationsbereich von 9 µg/ml bis 50 µg/ml einen linearen Verlauf. Nach dem Verlauf der Geraden liegt die Nachweisgrenze für Benzoessäure also zwischen 9 µg und 10 µg (die Gerade schneidet die Abszisse bei 9 µg).

Hippursäure: Ebenfalls wieder von einer äthanolischen Hippursäurelösung von 50 µg/ml ausgehend wurde folgende Standard-Verdünnungsreihe hergestellt: 1 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 15 µg/ml; 20 µg/ml; 30 µg/ml; 40 µg/ml und 50 µg/ml.

Die Menge je eines ml dieser Verdünnungsreihe wurde auf eine Platte aufgetragen, entwickelt und densitometrisch bei einer Wellenlänge von 256 nm ausgewertet (s. Abb. 6).

Die Eichkurve, die nach der gleichen Formel wie oben erstellt wurde, zeigt von einer Hippursäuremenge von 0,2 µg bis zu einer Menge von 7 µg einen linearen Verlauf, danach nähert sich die Kurve asymptotisch einer Parallelen der Abszisse (s. Abb. 8).

Der Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse liegt bei 0,2 µg, die quantitative Nachweisgrenze für Hippursäure liegt also zwischen 0,2 und 0,5 µg.

Da die Urinkonzentration von Hippursäure physiologischerweise

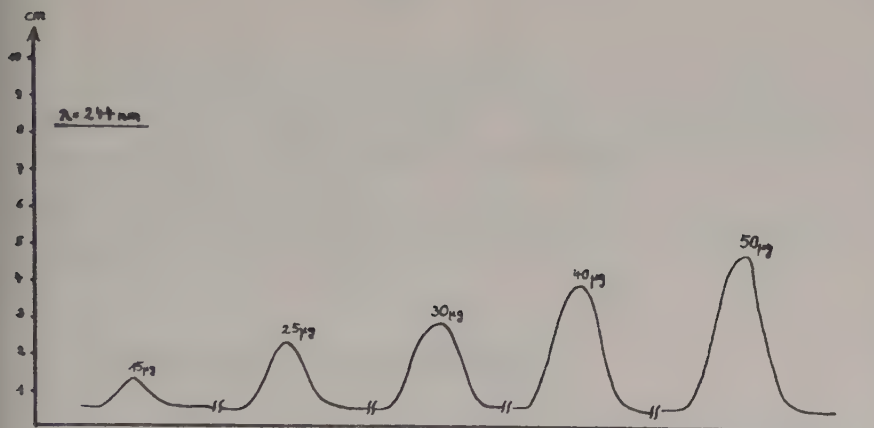


Abb. 5 Graphische Darstellung der bei verschiedenen Benzoesäure-Standardkonzentrationen densitometrisch erhaltenen Peaks

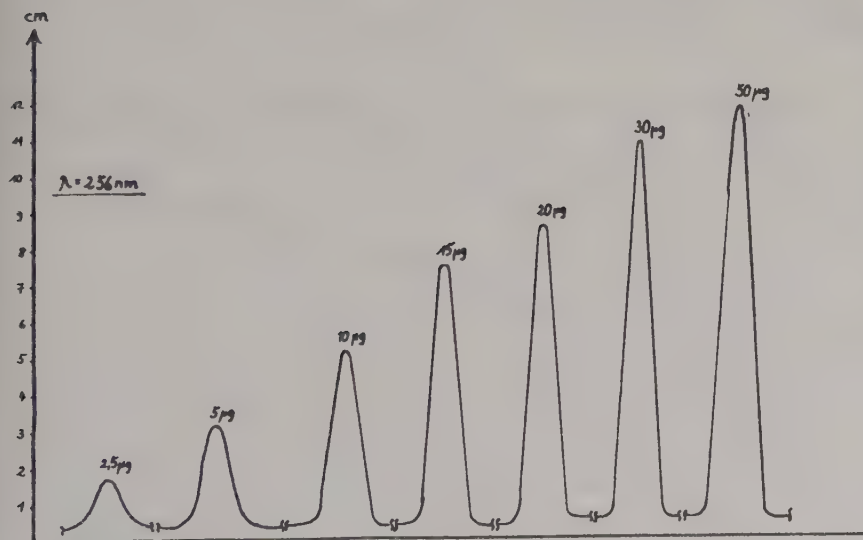


Abb. 6 Graphische Darstellung der bei verschiedenen Hippursäure-Standardkonzentrationen densitometrisch erhaltenen Peaks

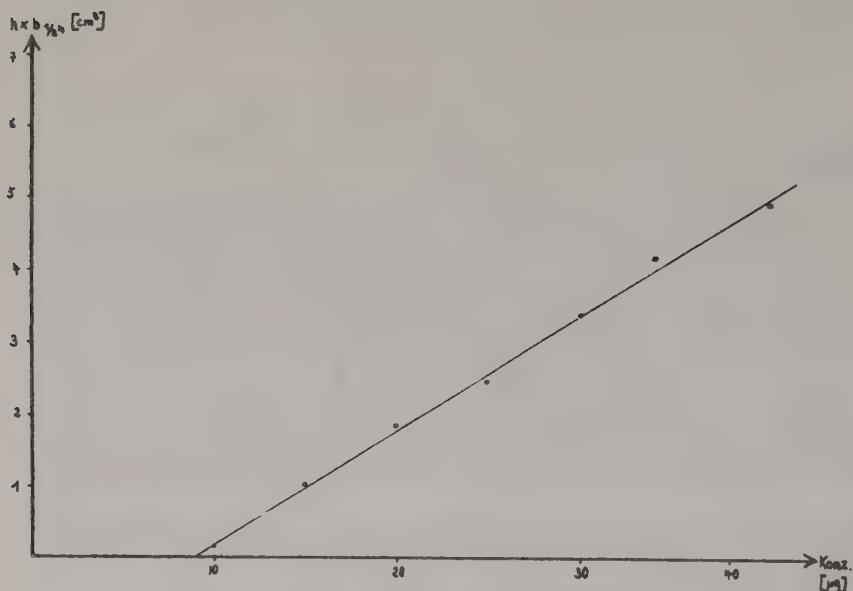


Abb. 7 Eichkurve für die spektraldensitometrische Bestimmung von Benzoesäure im Konzentrationsbereich von 5-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

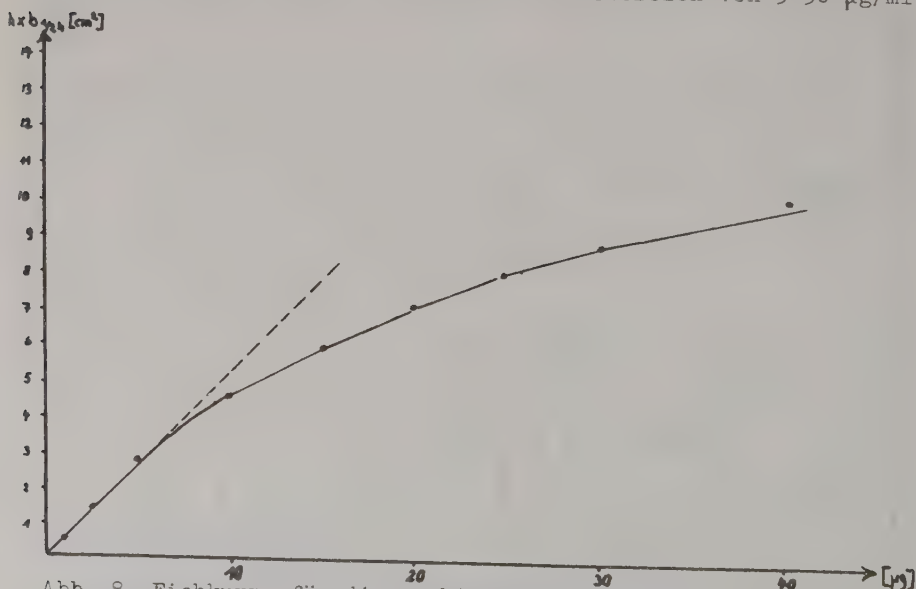


Abb. 8 Eichkurve für die spektraldensitometrische Bestimmung von Hippursäure im Konzentrationsbereich von 1-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

zwischen 0,3 und 1,4 $\mu\text{g/ml}$ liegt, ist es zur Hippursäurebestimmung im Urin notwendig, den Urin 1 : 99 mit Aqua dest. zu verdünnen. Ein typisches, densitometrisch ausgewertetes Chromatogramm zeigt die Abb. 9.

Blutserum braucht natürlich nicht verdünnt zu werden (Chromatogramm s. Abb. 10).

3.3.1.4 Wiederauffindungsversuche

Im Rahmen der "Recovery-Bestimmung" dieses Verfahrens wurde von 10 gesunden Kontrollpersonen ein Teil des Urins mit Benzoesäure versetzt (Konzentration: 20 $\mu\text{g/ml}$), der andere Teil wurde als Referenzsubstanz unbehandelt belassen. Alle 20 Proben wurden nun dem oben beschriebenen Verfahren unterworfen und spektraldensitometrisch ausgewertet. Typische, densitometrisch ausgewertete Chromatogramme zeigen die Abb. 11 (Urin) und 12 (Urin + Benzoesäure (20 μg)).

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate liegt bei 93,4 % (80,7 - 106,8 %), die Standardabweichung beträgt $\pm 1,45 \mu\text{g}$, dies entspricht einem Variationskoeffizienten (bzw. einer relativen Standardabweichung) von ca. 7,8 % (s. Tab. 3).

Im Verlaufe dieser Untersuchungen stellte es sich heraus, daß man unbedingt darauf zu achten hat, nur sauer reagierenden Urin für diese Untersuchungen zu verwenden. Schon QUICK (73) und SCHACHTER (85) wiesen darauf hin, daß es sich bei dem im Urin in geringen Mengen vorhandenen Benzoylglucuronid um eine äußerst labile Verbindung handelt (wesentlich labiler als beispielsweise die Hippursäure), die in alkalischem Milieu einer hydrolytischen Spaltung obliegt. Als Folge findet man freie Benzoesäure im Urin, was zu falschen Untersuchungsergebnissen und Schlüssen führen kann.

Weiterhin stellte sich heraus, daß Medikamente oder deren Metabolite ein ernsthaftes Problem bei diesem Bestimmungs-

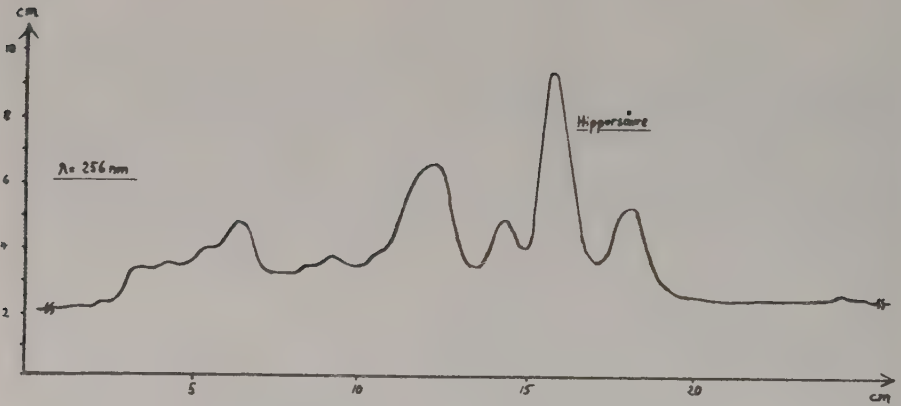


Abb. 9 Graphische Darstellung der spektraldensitometrischen Auswertung des Extraktes von 1 ml menschlichen Urins nach dünnsschichtchromatographischer Trennung

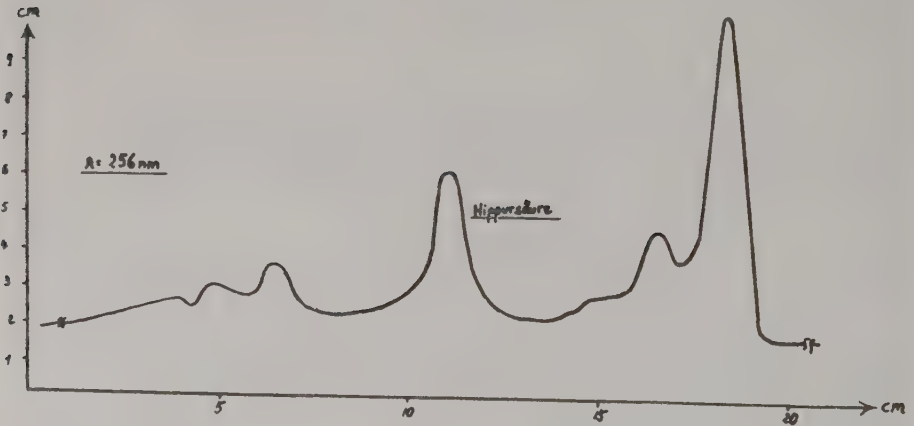


Abb. 10 Graphische Darstellung der spektraldensitometrischen Auswertung des Extraktes von 1 ml menschlichen Serums nach dünnsschichtchromatographischer Trennung

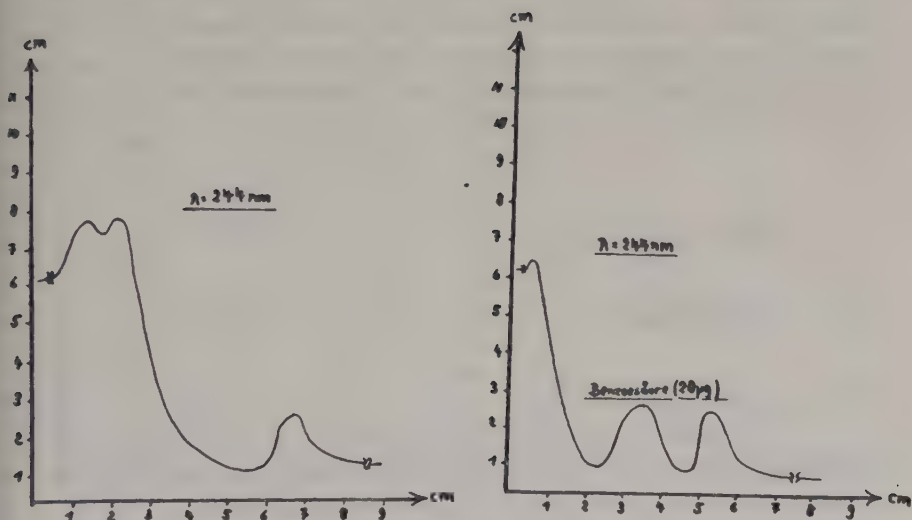


Abb. 11 u. 12 Graphische Darstellung der spektraldensitometrischen Auswertung des Extraktes von 1 ml menschlichen Urins (Abb. 12: Urin mit Benzoessäure versetzt (20 µg/ml)) nach dünnschichtchromatographischer Trennung

verfahren sind. Es kam öfter vor, daß bei Testpersonen, die bestimmte Medikamente nahmen, die Benzoesäure auf der entwickelten Platte von anderen Verbindungen überlagert war, so daß ihre eindeutige Bestimmung nicht möglich war.

Zu erwähnen ist schließlich, daß sich einzelne Chromatogramme (von Personen, die gesund waren und keine Medikamente zu sich nahmen) voneinander unterschieden, was zum einen Teil an unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten, zum anderen Teil an genetisch bedingten Stoffwechselvarianten liegen mag.

3.3.2 Gaschromatographie

3.3.2.1 Extraktion (s. oben)

3.3.2.2 Eichkurven

Benzoesäure: Von der Benzoesäure-Stammlösung von 50 µg/ml ausgehend, wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt:

2 µg/ml; 4 µg/ml; 6 µg/ml; 8 µg/ml; 10 µg/ml; 12 µg/ml;
14 µg/ml; 16 µg/ml; 18 µg/ml; 20 µg/ml; 25 µg/ml; 30 µg/ml;
35 µg/ml und 40 µg/ml.

Je 1 ml dieser Lösungen wurde eingedampft, in oben beschriebener Weise mit MSTFA behandelt und je 1 µl eingespritzt.

Die Auswertung der Standard-Chromatogramme (s. Abb. 13) erfolgte nach der Formel: Peakhöhe x Elutionszeit (in cm).

Die Mindestnachweisgrenze für die Trimethylsilylierte Benzoesäure liegt zwischen 1 und 2 µg/ml, die Eichkurve (s. Abb. 14) hat in dem gesamten Konzentrationsbereich von 2 µg - 40 µg/ml einen linearen Verlauf, die durchschnittliche Elutionszeit beträgt ca. 11,3 Minuten.

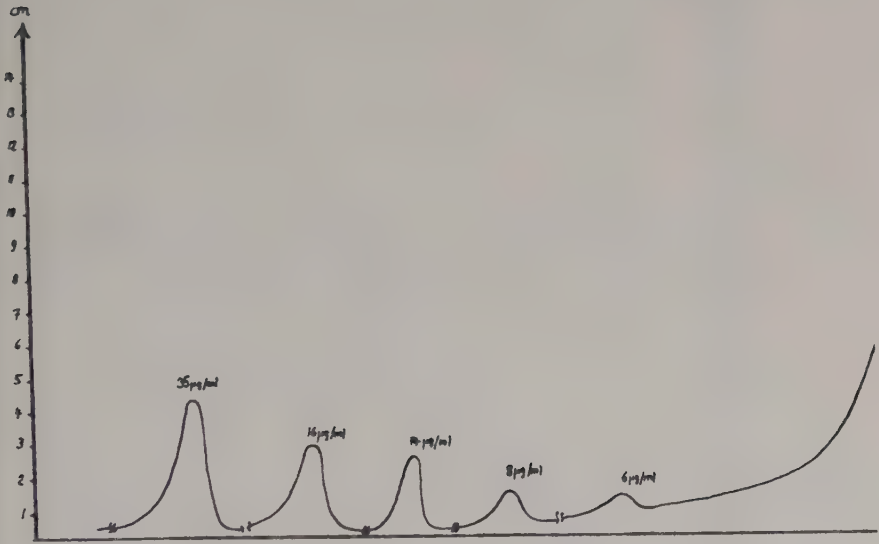


Abb. 13 Graphische Darstellung der bei verschiedenen Benzoesäure-Standardkonzentrationen erhaltenen Peaks

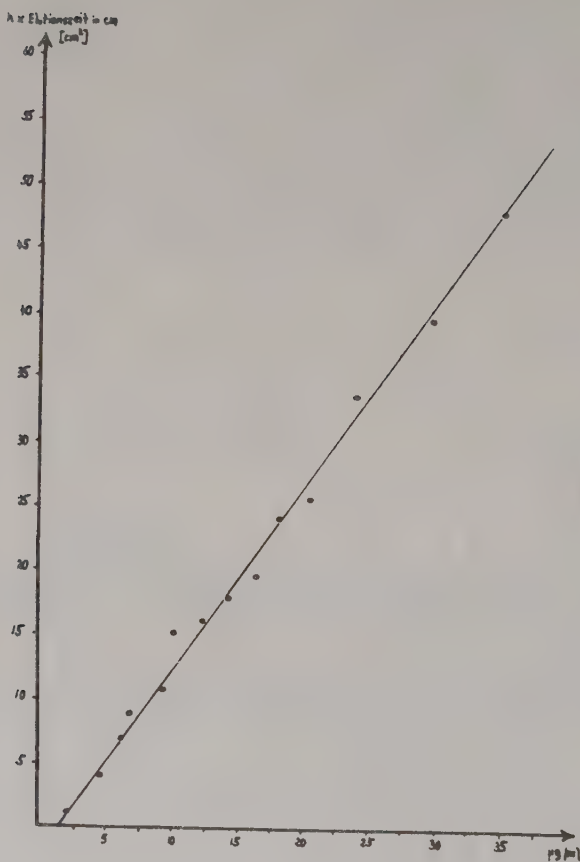


Abb. 14 Eichkurve für die gaschromatographische Bestimmung von Benzoesäure im Konzentrationsbereich von 2-40 µg/ml

Da die Auswertung der Chromatogramme nicht unter Verwendung eines "Inneren Standards", sondern mit Hilfe des oben genannten Produktes geschah und somit auf das exakte Einspritzen von je 1 μ l der MSTFA-Lösung angewiesen war, ließ sich eine gewisse Streuung der Werte nicht vermeiden.

Hippursäure: Mit MSTFA versetzte Hippursäure ließ sich gas-chromatographisch nicht darstellen.

Benzoylperoxid: Das Einspritzen von mit MSTFA versetztem Benzoylperoxid ergab einen Peak im Chromatogramm nach ca. 11 Minuten, was auf einen Zerfall des Benzoylperoxids und eine Methyl-Silylierung der entstehenden Benzoessäure hinweist.

3.3.2.3 Wiederauffindungsversuche

Bevor mit den eigentlichen "Recovery-Versuchen" begonnen wurde, wurden je eine Urin- und Plasmaprobe mit Benzoessäure versetzt (40 μ g/ml) und mit je einer entsprechenden, nicht mit Benzoessäure versetzten Probe verglichen (s. Abb. 15 - 18).

Die Entwicklung eines Urin- bzw. Plasmachromatogramms dauert ca. 20 bzw. 26 Minuten.

Dabei wurde (wie auch bei nachfolgenden Versuchen) bei dem "Urin-Leerwert" trotz aller Erwartung nach ca. 11,3 Minuten ein kleiner Peak registriert, der eindeutig methylsilylierte freie Benzoessäure nachwies. Es mußte somit berücksichtigt werden, daß der bei den Recoveryversuchen verwendete Urin verschiedentlich geringste Mengen an freier Benzoessäure enthielt. Ferner mußte in Betracht gezogen werden, daß zahlreiche aromatische Verbindungen, die normale (wie Benzoylglucuronid, Phenol und p-Kresol) oder gelegentliche (wie bestimmte Metabolite von Medikamenten) Komponenten des Urins sind, zu Benzoessäure zersetzt werden können und somit gleichzeitig

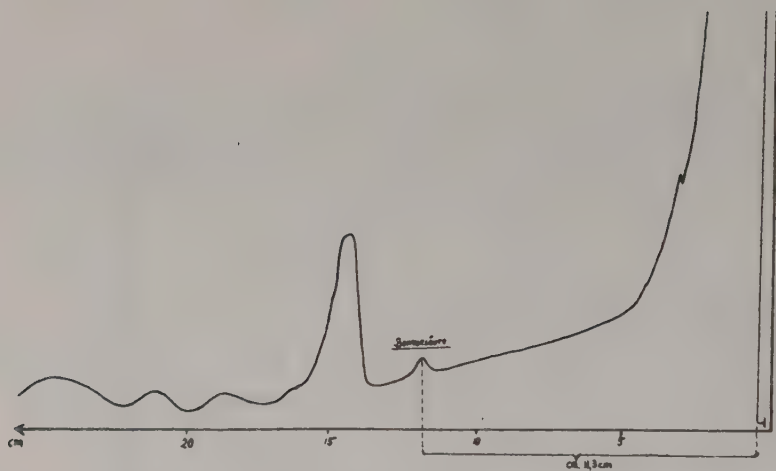


Abb. 15 Graphische Darstellung der gaschromatographischen Auswertung von extrahiertem menschlichen Urin

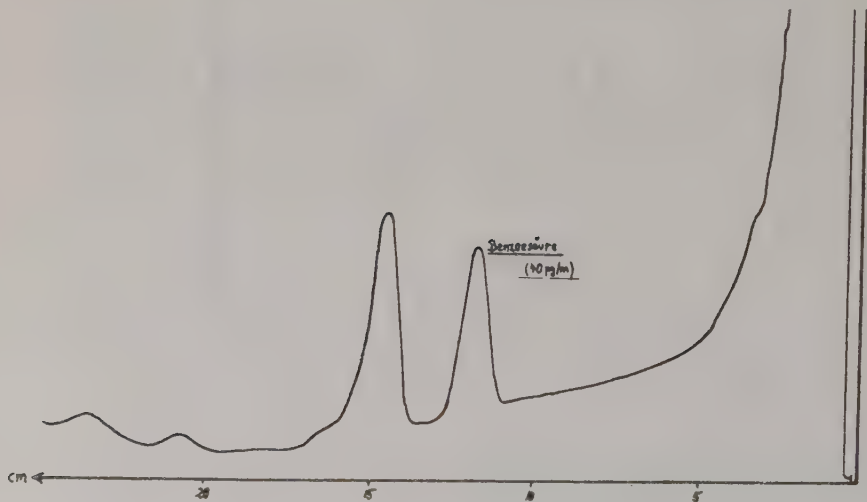


Abb. 16 Graphische Darstellung der gaschromatographischen Auswertung von mit Benzoesäure versetztem (40 µg/ml) und extrahiertem menschlichen Urin

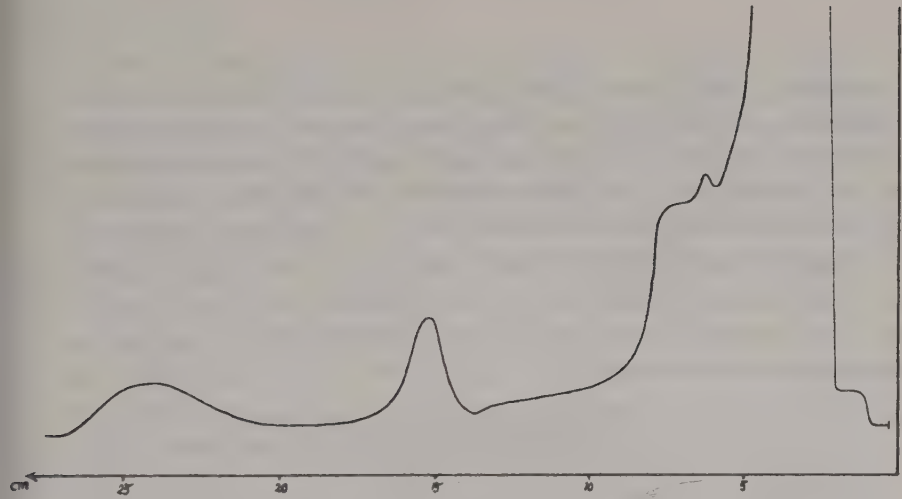


Abb. 17 Graphische Darstellung der gaschromatographischen Auswertung von extrahiertem menschlichen Serum

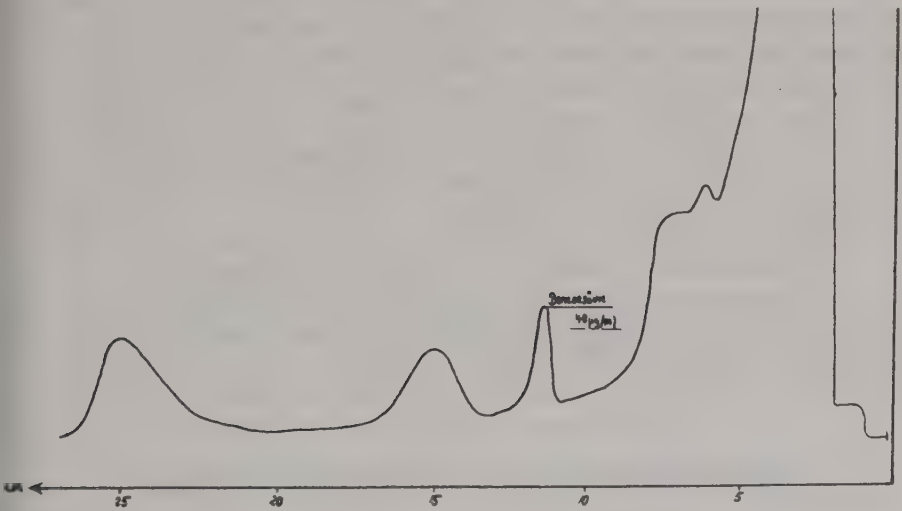


Abb. 18 Graphische Darstellung der gaschromatographischen Auswertung von mit Benzoesäure (40 µg/ml) versetztem und extrahiertem menschlichen Serum

mit der zugesetzten freien Benzoessäure bestimmt werden. Da die Menge der in dieser Recovery-Versuchsreihe dem Urin zugesetzten Benzoessäure sehr gering war, mußte in solchen Fällen die im Leerwert ermittelte Benzoessäure von der Menge der in den Benzoessäure-Proben gemessenen Säure subtrahiert werden.

Im weiteren Arbeitsgang wurden 10 Urin- und 10 Plasmaextrakte von einer Kontrollperson mit je 20 µg Benzoessäure versetzt und diese Proben einschließlich je eines Leerwertes gaschromatographisch ausgewertet.

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug für die Urinproben 92,3 %, für die Plasmaproben 69,2 %.

Die Standardabweichung betrug $\pm 1,8 \mu\text{g}$, der Variationskoeffizient $\pm 9,76 \%$ für die Urinproben, bzw. $\pm 1,79 \mu\text{g}$ und $\pm 9,68 \%$ für die Plasmaproben (s. Tab. 4).

Diese gaschromatographische Versuchsreihe ist zwar mit etwas weniger Arbeitsaufwand verbunden und auch empfindlicher als die Densitometrie, in bezug auf Versuchsdauer und Exaktheit ist sie jedoch in der beschriebenen Form der spektraldensitometrischen Bestimmung unterlegen. Zudem ist ohne eine vorhergehende Hydrolyse der Hippursäure zu Benzoessäure eine Bestimmung des Gehalts von Plasma und Urin an Hippursäure unter Verwendung von MSTFA nicht möglich.

Es wurden noch Versuche mit einer anderen Säulenbepackung (SE 30) durchgeführt, bei welcher jedoch die Elutionszeiten deutlich verlängert waren und zudem die Nachweisgrenze für Benzoessäure bei ca. 4 µg/ml lag.

3.3.3 Säulenchromatographie und spektralphotometrische Auswertung

Grundlage dieses analytischen Verfahrens ist eine Veröffentlichung von SINHA und GABRIELI (91).

Abweichend von der von ihnen beschriebenen Versuchsanordnung wurde für die Bestimmung von Benzoesäure eine Säule doppelter Länge verwendet, der Urin lediglich 1 : 1 mit Puffer verdünnt (SINHA und GABRIELI gingen bei ihren Untersuchungen von Benzoesäure-Urinkonzentrationen von 0,5 - 2,5 mg/ml aus und verdünnten den Urin 1 : 5!) und eine spektralphotometrische Meßwellenlänge von 225 nm, dem Absorptionsmaximum für in Puffer gelöste Benzoesäure nach Erstellung einer Absorptionskurve (s. Abb. 19) gewählt.

Das Absorptionsmaximum von in Puffersubstanz gelöster Hippursäure liegt bei 228 nm. Diese Werte stimmen exakt mit den Untersuchungsergebnissen von RIEDER (79) überein.

Hippursäure und Benzoesäure absorbieren erst im Bereich unter 280 nm deutlich. Beide Substanzen zeigen sehr hohe Maxima im außerhalb unseres Meßbereiches liegenden Gebiet unterhalb 200 nm. Daneben existieren die oben angegebenen ausgeprägten Maxima von 228 bzw. 225 nm. Es ist infolgedessen notwendig, über ein Instrument zu verfügen, welches auch in diesem kleinsten Bereich mit genügender Exaktheit mißt. Die vorliegenden Untersuchungen wurden daher mit einem "Registrierenden Spektralphotometer DMR 10" durchgeführt.

Im Hinblick auf die große Menge der physiologischerweise im Urin befindlichen Hippursäure empfiehlt es sich, bei ihrer Bestimmung den Urin gemäß den Angaben von SINHA und GABRIELI vor der Chromatographie 1 : 5 mit Puffer zu verdünnen.

Will man Benzoesäure und Hippursäure simultan bestimmen, ist es notwendig, nach der für die quantitative Analyse von Benzoesäure beschriebenen Versuchsanordnung ($\lambda = 225$ nm, Verdünnung des Urins von 1 : 1, (s. 3.2.3)) vorzugehen.

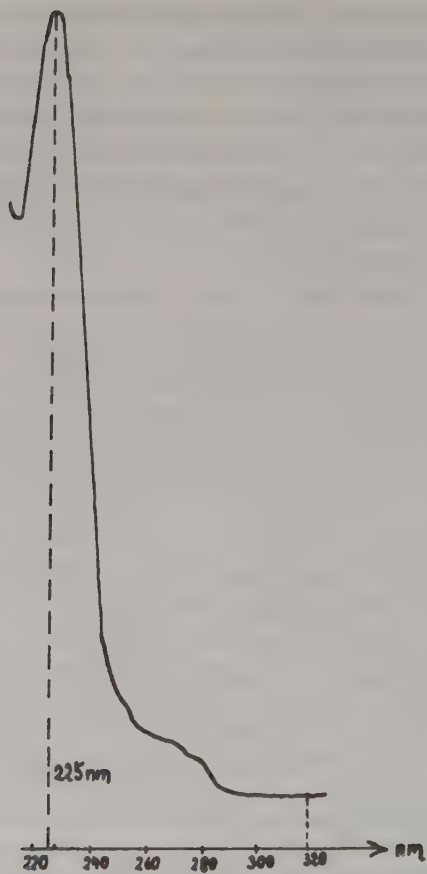


Abb. 19 Absorptionsspektrum von Benzoesäure in 0,1 m Phosphatpuffer (pH 7)

3.3.3.1 Eichkurven

Ausgehend von einer Stammlösung von in Puffersubstanz gelöster Benzoesäure von 50 µg/ml wurde folgende Verdünnungsreihe hergestellt: 0,1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 1 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml und 25 µg/ml.

Die Messung der Extinktionen dieser Konzentrationen gegen einen Puffer-Leerwert bei einer Wellenlänge von $\lambda = 225 \text{ nm}$ zeigte einen vollständig linearen Verlauf der Kurve (s. Abb. 20).

Analoge Ergebnisse wurden auch mit Hippursäure-Verdünnungsreihen ($\lambda = 225 \text{ nm}$) erzielt. Im Bereich dieser Konzentrationen wird also das Lambert-Beer'sche Gesetz vollkommen erfüllt.

Benzoylperoxid war in der wässrigen Phase unlöslich, so daß keine Eichkurve erstellt werden konnte.

3.3.3.2 Kalibrierung

Im Rahmen der Bestimmung der Elutionsvolumina und damit der Kalibrierung eines Urin- bzw. Plasmachromatogramms wurde 1 ml eines Lösungsgemisches von 50 µg/ml Benzoesäure, 50 µg/ml Hippursäure und 100 µg/ml Kreatinin auf die Gel-Säule gegeben.

Von einem Elutionsvolumen von 46,2 ml bis zu einem Volumen von 55 ml reicht der erste Peak, die Kreatininfraktion, die somit innerhalb eines fraktionierten Volumens von 8,8 ml ($\hat{=}$ 4 Reagenzgläser à 2,2 ml) die Säule verläßt.

Der 2. Peak, der Hippursäure-Peak reicht von einem Volumen von 74,8 ml bis zu einem Elutionsvolumen von 90,2 ml, dies entspricht einer Fraktion von 15,4 ml ($\hat{=}$ 7 Reagenzgläser à 2,2 ml).

Die 3. Fraktion, die Benzoesäure-Fraktion, befindet sich in einem Volumen zwischen 96,8 ml und 116,6 ml, dies entspricht

einem Elutionsvolumen von 19,8 ml ($\hat{=}$ 9 Reagenzgläser à 2,2 ml) (s. Abb. 21).

Die Trenntendenz dieser Dextrangel-Säule in bezug auf diese drei urinären Inhaltsstoffe ist somit trotz der großen fraktionierten Einzelvolumina von je 2,2 ml ideal.

3.3.3.3 wiederfindungsrate für Benzoessäure

Zur Bestimmung der "Recovery" dieses säulenchromatographischen Verfahrens wurden je zwei Proben einer Lösung von 50 µg/ml, 25 µg/ml, 15 µg/ml und 10 µg Benzoessäure/ml Puffer auf die Säule aufgegeben. Die Wiederfindungsraten aller 8 Proben lagen über 90 %, die durchschnittliche Recovery betrug ca. 94,6 % (90,2 % - 98,6 %) (s. Tab. 5). Die Ermittlung der Wiederfindung erfolgte durch die Berechnung der Benzoessäuremenge eines jeden fraktionierten Benzoessäure-haltigen Einzelvolumens (2,2 ml). Deren Summe ergab die gesuchte Gesamtmenge.

Die Mindestnachweisgrenze für Benzoessäure lag bei ca. 5 µg.

Bei allen diesen Angaben muß allerdings betont werden, daß die Benzoessäure als in Puffer und nicht in Urin gelöste Reinsubstanz chromatographiert wurde.

3.3.3.4 Chromatogramme von mit Benzoessäure versetztem Urin

Eine mit Benzoessäure versetzte Urinprobe (Konz. = 40 µg/ml) wurde im Verhältnis 1 : 1 mit Puffersubstanz verdünnt und 1 ml dieser Lösung (= 20 µg Benzoessäure) auf die Säule aufgegeben.

Analog zu den Angaben von SINHA und GABRIELI wurden die Substanzen Glucuronsäure, Oxalsäure und Phenol in der Säule retiniert, während die anderen im unteren UV-Bereich absorbierenden Verbindungen (Aminosäuren (Glycin, L-Cystin, L-Asparagin-

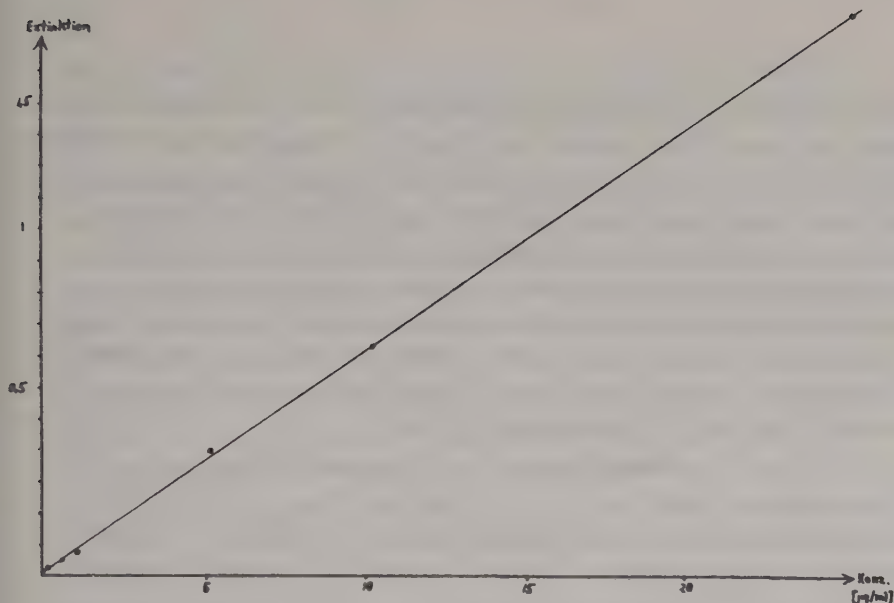


Abb. 20 Eichkurve für die spektralphotometrische Bestimmung von Benzoesäure im Konzentrationsbereich von 0,1-25 $\mu\text{g/ml}$

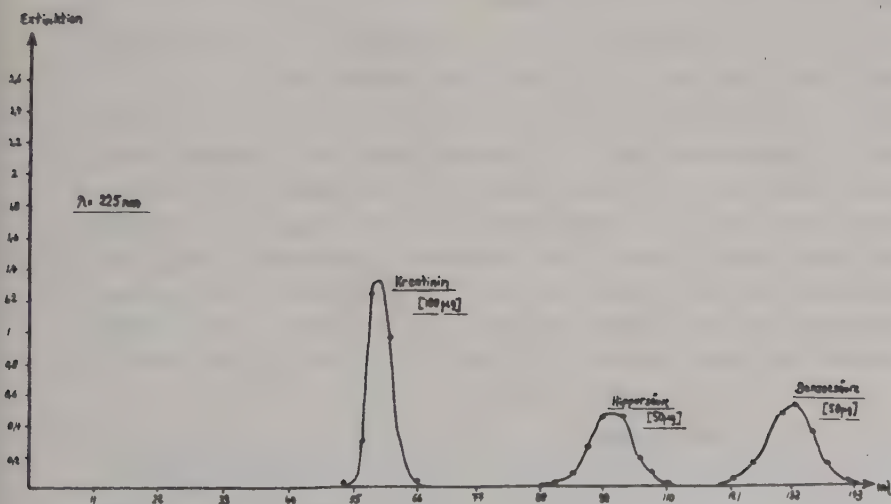


Abb. 21 Graphische Darstellung der spektralphotometrischen Auswertung von 100 μg Kreatinin, 50 μg Hippursäure und 50 μg Benzoesäure nach säulenchromatographischer Trennung

säure), Kreatinin, Hippursäure, Benzoessäure und Harnsäure) die Säule mit guter Trenntendenz durchliefen (Chromatogramm s. Abb 22)

Vor großem Nachteil waren jedoch die Tatsachen, daß sich die Ausläufer sämtlicher Peaks überlagerten, was zum einen Teil an den sehr großen Mengen der aufgegebenen Aminosäuren, des Kreatinins und der Hippursäure, zum anderen Teil an dem großen Volumen einer jeden fraktionierten Einzelmengen (je 2,2 ml) lag. Eine weitere Verdünnung des Urins hätte zur Folge gehabt, daß die Menge der Aufgegebenen Benzoessäure unterhalb der Nachweisgrenze dieses Verfahrens gelegen hätte.

Exakte quantitative Bestimmungen der Benzoessäure waren aus diesen Gründen nicht möglich, die Analyse kann jedoch als ein technisch sehr einfaches, relativ genaues, schnelles und gut reproduzierbares halbquantitatives Verfahren angesehen werden.

Die säulenchromatographische Trennung und Elution sämtlicher im Urin befindlicher Substanzen dauert bei der verwendeten Säule (90 x 1 cm) ca. 4 Stunden.

Laut SINHA und GABRIELI soll die Anwendung dieses Verfahrens uneingeschränkt auf Blutplasma übertragbar sein.

Eine drastische Verlängerung der Dextrangel-Säule erbrachte zwar in Zusatzversuchen eine verbesserte Trenntendenz (sämtliche Peaks waren optimal voneinander getrennt, die Kurve berührte zwischen ihnen die C-Linie), doch ging dieser Vorteil mit einer stark reduzierten Recovery, einer sehr langen Analysendauer und einer größeren Menge im Spektralphotometer auszuwertender fraktionierter Einzelvolumina einher. Dieser Mehraufwand an Arbeit stand in keinem Verhältnis zu den Vorteilen, die die Verlängerung der Säule mit sich brachte.

In einem letzten Zusatzversuch wurde durch eine vorgeschaltete Ionen-austauschchromatographie mittels einer "Dowex 50 X 8 (H⁺-Form 50 - 100 mesh Säule) versucht, das Ergebnis zu verbessern. ELLIOT (21) berichtete, daß Substanzen wie Hippursäure,

Benzoessäure und Harnsäure unverändert die Säule verließen, während Kreatinin und freie Aminosäuren in der Säule retiniert wurden.

Diese Angaben konnten in Versuchen gemäß der Versuchsanleitung von ELLIOT (21) bestätigt werden.

Die Vorbehandlung einer Menge von 1 ml Urin mittels Ionen-Austauschchromatographie und Aufgabe des in Puffersubstanz gelösten Extrakts auf die Gel-Säule ergaben ganz hervorragende Ergebnisse (Chromatogramm s. Abb. 23).

Die Recovery war nur geringfügig erniedrigt, während das Chromatogramm klar voneinander abgetrennte Peaks aufzeigte, so daß sie quantitativ ausgewertet werden konnten.

Da jedoch die Versuchsdauer sehr lang und dieses kombinierte Verfahren relativ komplex und stör anfällig ist, kann es als Routineverfahren eines klinischen Labors nicht ohne Bedenken angewendet werden.

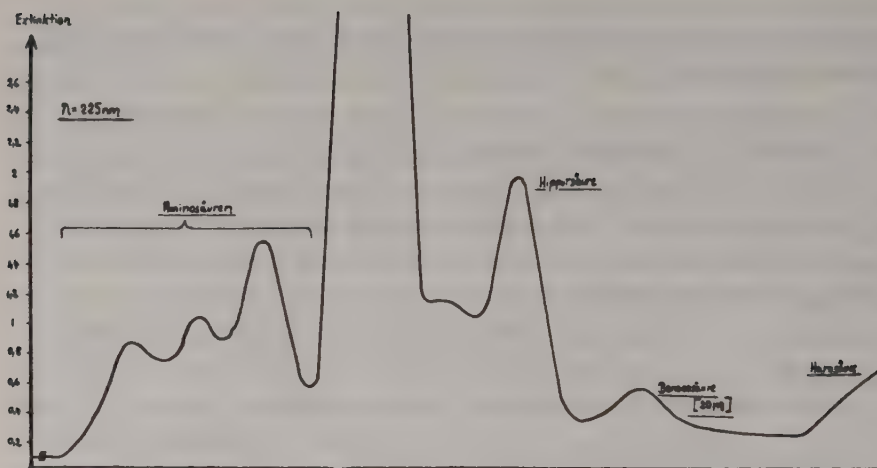


Abb. 22 Graphische Darstellung der spektralphotometrischen Auswertung von mit Benzoesäure (20 µg/ml) versetztem Urin nach säulenchromatographischer Trennung

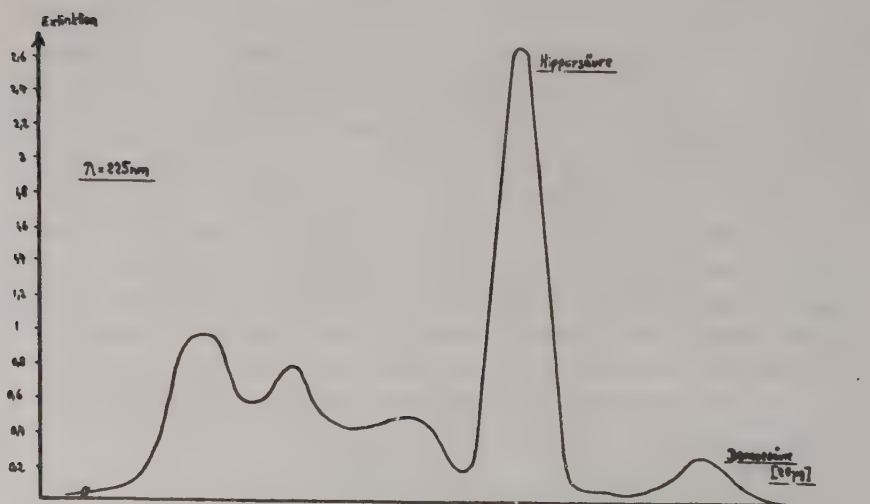


Abb. 23 Graphische Darstellung der spektralphotometrischen Auswertung von mit Benzoesäure (20 µg/ml) versetztem Urin nach Ionen-Austauschchromatographie und säulenchromatographischer Trennung

4 DISKUSSION

Bei einer Zusammenstellung der Literatur, die sich mit dem Metabolismus von Benzoesäure im tierischen Organismus befaßt, stößt man auf eine Fülle von quantitativen Analysenverfahren vor allem zur Bestimmung des Hauptmetaboliten der Benzoesäure, der Hippursäure. Nur wenige analytische Methoden implizieren die simultane Bestimmung freier Benzoesäure und Hippursäure in biologischen Flüssigkeiten. Solche Verfahren gewannen erst an Bedeutung, als man Erkenntnisse über charakteristische Veränderungen des Benzoesäure-Stoffwechsels bei bestimmten Krankheitsbildern (s.o.) gewann.

Die seit Mitte des vorigen Jahrhunderts veröffentlichten Techniken zur Bestimmung von in Urin enthaltener Hippursäure reichen von gravimetrischen (9, 17, 75, 76, 96) und titrimetrischen Verfahren (27, 52, 72, 109, 120) über sog. "Kjeldahl"-Methoden (32, 115) bis zu Isotopen-Verdünnungsmethoden mit ^{14}C -Hippursäure (89).

Es ist offensichtlich, daß die meisten oben genannter Verfahren entweder "grobe" Makromethoden sind, die große Volumina an Urin für die Analytik benötigen bzw. zu der Gruppe äußerst komplexer und/oder zeitaufwendiger Techniken gehören, die für die Bestimmung von Mikrogramm an Hippursäure oder für die Routine-Anwendung in einem klinischen Labor ungeeignet sind. Zudem sind sämtliche Methoden für eine quantitative Bestimmung eventuell im Urin/Blutplasma vorhandener freier Benzoesäure ungeeignet.

Um diese methodischen Mängel zu beheben, wurde eine ganze Anzahl von kolorimetrischen Verfahren entwickelt.

Die Methode von DENIGES (19), in welcher aus Hippursäure ein "N-Bromobenzamid-Derivat" synthetisiert wird, ist nur für

Benzoyl-Glycin-Bestimmungen im Konzentrationsbereich um 500 µg/ml anwendbar. KEHL (49) vermochte in einer Weiterentwicklung dieser Methodik viele Schwierigkeiten zu umgehen und erhöhte durch Modifikationen die Zuverlässigkeit der Methode. Trotz dieser Verbesserungen kann das Verfahren nicht in die Reihe der einfachen und zuverlässigen, mikroanalytischen Techniken eingeordnet werden.

Gleiches gilt für die im Jahre 1964 von NAGANO und OGIYA (64) entwickelte kolorimetrische Methode.

Ebenso wie bei der titrimetrischen Bestimmung machte man sich bei den kolorimetrischen Verfahren die Möglichkeit der alkalischen Hydrolyse von Hippursäure zunutze.

NICHOLLS (Analyst, 53, 19, 1928) entwickelte eine Farbreaktion, die auf der Oxidation von Benzoesäure zu Salicylsäure durch Wasserstoffperoxid basiert. Salicylsäure ist kolorimetrisch bestimmbar. Dieser Oxidationsvorgang erfaßt jedoch nur ca. 10 % der zu oxidierenden Benzoesäure und ist so für quantitative Erhebungen unbefriedigend.

RADICS-AJTEI (78) modifizierte diese Methodik derart, daß sie mit befriedigenden Resultaten in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 8,0 mg Hippursäure/ml Urin quantitativ anwendbar ist.

Analog der Benzoesäure, läßt sich auch das entstehende Glycin farblich darstellen und somit photometrisch messen. WEBB (108) arbeitete mit der bekannten Ninhydrinmethode, andere Autoren (2, 11, 24) berichten über spezifischere Verfahren, deren Beschreibung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Mit einer relativen Standardabweichung von weniger als $\pm 5\%$ zeigen sie in einem Konzentrationsbereich von 10 - 100 µg Hippursäure/ml Urin Ergebnisse, die ihre Anwendung rechtfertigen.

Die kolorimetrische Technik von DICKENS und PEARSON (20) ist eine Weiterentwicklung des von WAELSCH und BUSZTIN (Hoppe-Seyl. Z., 249, 135, 1937) beschriebenen Verfahrens. Sie basiert

auf einer Nitrierung von Benzoesäure bei Raumtemperatur, Reduzierung der resultierenden Mononitro-Benzoesäure zu Amino-Benzoesäure, Diazotierung der letztgenannten und Bindung an eine zu einer Farbreaktion führenden Base. Das Verfahren wird abgeschlossen durch eine kolorimetrische Messung der Farbtintensität der Lösung und ist für Proben anwendbar, die 0,05 - 10 mg Benzoesäure oder eine äquivalente Menge an Hippursäure enthalten.

Die "Recovery" dieses Verfahrens liegt bei einer Benzoesäure- bzw. Hippursäuremenge zwischen 0,1 und 1 mg über 90 %, die relative Standardabweichung beträgt in diesem Mengenbereich für Benzoesäure ca. 6 %, für Hippursäure ca. 3 %.

Zusammenfassend muß allerdings über dieses Verfahren gesagt werden, daß es trotz guter Ergebnisse zu zeitaufwendig und kompliziert für den Routine-Gebrauch in einem klinischen Labor ist.

GAFFNEY und Mitarbeiter (30) berichten über eine Hippursäure-Bestimmungsmethode, die sich aus einer Papierchromatographie, kombiniert mit einer neuartigen Farbreaktion zusammensetzt.

Diese beruht auf der Bildung eines orange-ockerfarbenen Azlactons durch Hippursäure und p-Dimethylaminobenzaldehyd in Gegenwart von Essigsäure-Anhydrid (sog. Gaffney-Reagenz). Quantitative photometrische Hippursäure-Bestimmungen sind in einem Mengenbereich von 10 - 100 µg möglich. Von Nachteil ist der sehr große zeitliche Aufwand dieser Methode.

Die geschilderte Technik, beruhend auf der Verwendung des "Gaffney-Reagenzes", wurde von zahlreichen Autoren übernommen (z.B. ARMSTRONG und Mitarbeiter (3)) und modifiziert. MASREY und Mitarbeiter (60) änderten diese Prozedur derart, daß die Hippursäure-Bestimmungen ohne Papierchromatographie möglich waren. Quantitative Bestimmungen von 50 - 250 µg/ml in wässriger Lösung wurden mit einer relativen Standardabweichung von $\pm 10\%$

im niedrigen Konzentrationsbereich bzw. von $\pm 5\%$ im höheren Konzentrationsbereich mit guter Reproduzierbarkeit vollzogen.

TEUCHY und VAN SUMERE (100) erarbeiteten auf der Grundlage der von GAFFNEY beschriebenen Farbreaktion eine sehr empfindliche, schnelle und zuverlässige Methode für die Mikrobestimmung von Hippursäure im Urin. Die Technik besteht aus einer dünnschichtchromatographischen Trennung der aus Urinproben extrahierten Substanzen, gefolgt von dem Besprühen des entwickelten Chromatogrammes mit "Gaffney-Reagenz". Die sich darstellenden "Hippursäure-Flecken" werden mittels Methanol extrahiert und photometrisch bei einer Wellenlänge von 470 nm bestimmt. In einem Mengenbereich von 0 - 100 μg Hippursäure wurden gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt, die Recovery dieser Prozedur lag zwischen 98 und 100 %.

UMBERGER (104) beschreibt eine kolorimetrische Mikro-Bestimmung, die auf einer rot-orangen Farbbildung von Benzoylglycin mit Benzolsulfonylchlorid in Gegenwart von Pyridin beruht. Sie zeigt quantitative und gut reproduzierbare Ergebnisse in einem Hippursäure-Konzentrationsbereich von 1 μg - 250 $\mu\text{g/ml}$. Von Nachteil ist, daß die Methode in dieser Veröffentlichung nicht auf Urin-Extrakte übertragen wurde und höchstwahrscheinlich Salicylur-Säure und andere Aminosäuren mit der Hippursäure-Analyse interferieren.

Hochentwickelte, automatisierte kolorimetrische Verfahren wurden 1970 bzw. 1971 von BARNES (4) bzw. ROSEVEAR und Mitarbeitern (82) veröffentlicht. Nach Aufgabe eines bestimmten Volumens einer biologischen Flüssigkeit auf eine Kieselsäuresäule und Elutionen dieser Probe werden die die Säule verlassenden Elutionsvolumina kontinuierlich und automatisch mit einem gepufferten Indikator (z.B. Neutralrot) versetzt und gleichzeitig einer photometrischen Messung und Registrierung der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge unterzogen. Auf diese Weise können innerhalb eines Chromatogrammes bis

zu 40 in biologischen Proben enthaltene organische Säuren simultan quantitativ bestimmt werden.

ELLIOT (21) entwickelte eine UV-spektralphotometrische Methode für die Analyse von Hippursäure im Urin. Das Verfahren basiert auf einer Trennung der Hippursäure von anderen im UV-Bereich absorbierenden Komponenten durch Ionenaustausch-Chromatographie und quantitative Bestimmung der Säure im Eluat bei einer Wellenlänge von 232 nm. Die Recovery liegt zwischen 98,8 und 101,3 %. Das Verfahren ist relativ empfindlich und einfach durchführbar, ist jedoch nicht für die simultane Bestimmung von Benzoesäure und Hippursäure geeignet, da sich Benzoesäure (wenn im Urin vorhanden) ebenfalls im Eluat wiederfindet.

Im Verlaufe von Untersuchungen fanden sich jedoch, wie auch bei der praktischen Anwendung des von RIEDER (79) entwickelten Verfahrens zur Simultanbestimmung von Hippur- und Benzoesäure als binäres wässriges Lösungsprodukt, zahlreiche weitere, bei der quantitativen Bestimmung im UV-Bereich interferierende Substanzen, so daß beide Methoden einer kritischen Beurteilung nicht standhalten.

In dem von SCOTT (48, 86, 87) beschriebenen Verfahren werden vorbehandelte Urinproben einem automatisch ablaufenden System mit hoher analytischer Aussagekraft unterworfen. Es setzt sich aus einer Hochdruck-Anionenaustauschsäule für den Trennungsprozeß und einem kontinuierlich registrierenden, auf verschiedene Wellenlängen einstellbaren UV-Spektralphotometer für die quantitative Registrierung zusammen. Die Trennung der UV-Bestandteile wird erreicht durch die Elution mit einem Azetat-Puffer, dessen Konzentration im Verlauf der Analyse schrittweise erhöht wird. Das entwickelte Chromatogramm zeigt mehr als 140 Peaks einer Urin-Analyse, die eine gleichzeitige Bestimmung von Benzoe- und Hippursäure zuläßt. Die Empfindlichkeit dieses Systems liegt für die einzelnen Substanzen zwischen 1 - 10 µg.

Von großem Nachteil ist der erhebliche apparative Aufwand dieser Methodik und die Zeitdauer von über 40 Stunden, die eine einzige Analyse in Anspruch nimmt.

Einen Überblick über verschiedene Hochdruck-kation/anionenaustauschchromatographische Verfahren und ihre Anwendung in der klinischen Chemie geben TWITSCHETT und Mitarbeiter (103).

AMSEL und LEVY (1) entwickelten im Jahre 1969 ein einfaches UV-spektralphotometrisches Verfahren zur Bestimmung (allerdings keine Simultanbestimmung!) von Benzoessäure, Hippursäure und Benzoylglucuronid durch eine Kombination verschiedener Elutionsverfahren. Dieses extrem einfache, ohne großen apparativen und zeitlichen Aufwand praktizierte Verfahren besitzt eine Recovery zwischen 98 und 100 %, wurden von den Autoren allerdings lediglich für Substanzmengen, die sich im mg-Bereich bewegten, angewendet.

Die gleiche Kritik gilt auch für das von SINHA und GABRIELI (91) entwickelte System einer Kombination von Gel-Chromatographie und anschließender UV-spektralphotometrischer Messung biologischer Proben. Die Methodik zeigt in Mengenbereichen, die an der mg-Grenze liegen, gute Ergebnisse (Standardabweichungen 2,7 %, Recovery 95 - 102,5 %), ist jedoch, zumindest was die Mengen der pro ml im Urin enthaltenen Benzoessäure angeht, vollkommen unrealistisch.

ELLMAN et al. (22) bestimmten Hippursäure und Benzoessäure mittels einer fluorimetrischen Methode. Die Prozedur basiert auf der Fluoreszenz von Hippursäure und Benzoessäure in 70 % H_2SO_4 und zeigt eine Empfindlichkeit bis zu einer Endkonzentration von 0,2 μg Hippursäure pro ml Urin. Weitere Vorteile sind die geringe Menge des für die Prozedur benötigten Urins (2 μl) und die Tatsache, daß die Urinproben keiner Vorreinigung unterzogen werden müssen. Eine gleichzeitige Bestimmung von Benzoessäure und Hippursäure ist allerdings nicht möglich.

Eine elegante Methode zur fluorimetrischen Bestimmung von Benzoesäure entwickelten SINSHEIMER und BREAUULT (92) im Jahre 1971.

Nach erfolgter dünn-schichtchromatographischer Trennung maßen sie die Background-Fluoreszenz von Benzoesäure unmittelbar auf der Silica Gel G-Platte (mit Fluoreszenz-Indikator) unter einer UV-Lampe. Die Autoren berichten von einer großen Empfindlichkeit und guter Reproduzierbarkeit.

Eine große Zahl von Veröffentlichungen der letzten Jahre befassen sich mit der quantitativen gaschromatographischen Bestimmung aromatischer Säuren in biologischen Flüssigkeiten. Die Vorteile der Gaschromatographie als analytische Methode sind die Möglichkeit, mehrere Verbindungen in einer Analyse zu bestimmen, und die Tatsache, daß nur geringe Mengen einer biologischen Probe benötigt werden. Zudem gehören gaschromatographische Verfahren zu den empfindlichsten und genauesten Bestimmungsmethoden, die bekannt sind.

Zahlreiche Berichte beschreiben Techniken zur gaschromatographischen Bestimmung von Benzoesäure und/oder Hippursäure (6, 10, 12, 15, 18, 25, 34, 36, 37, 44, 45, 46, 47, 54, 69, 92, 98, 106, 107, 112, 113, 118) in organischen Flüssigkeiten.

Die Arbeiten von CHALMERS und WATTS (10), DALGLIESH und Mitarbeitern (18), JELLUM und Mitarbeitern (47), LANGENBECK und SEEGMILLER (54), PERRY und Mitarbeitern (69), WAN und RIEGELMAN (107) wie auch die von WILLIAMS (113) sind besonders hervorzuheben, da die von ihnen beschriebene Methodik eine gleichzeitige Bestimmung von Benzoesäure und Hippursäure zuläßt und somit dem im "Experimentellen Teil" beschriebenen gaschromatographischen Verfahren deutlich überlegen sind.

Eine grundlegende, diesbezügliche Arbeit wurde 1966 von DALGLIESH, HORNING et al. (18) veröffentlicht. Gemäß ihren Ergebnissen haben sich für die quantitative Erfassung organischer

aromatischer Carboxyl-Säuren besonders ihre vorhergehende Derivatisierung mit Diazomethan zu Methylestern oder mittels einer Trimethylsilyl-Verbindung zu Trimethylsilyl-Estern als vorteilhaft erwiesen. Eine Vorbehandlung mit diesen Verbindungen reduziert die Polarität und erhöht die thermische Stabilität und Flüchtigkeit (und damit den Dampfdruck) der oben genannten Säuren.

Unter Verwendung von Diazomethan zur Methylierung von Benzoe- bzw. Hippursäure arbeiteten JELLUM und Mitarbeiter, LANGENBECK und SEEGMILLER, PERRY et al. wie auch WILLIAMS.

Unter Verwendung einer definierten Menge eines geeigneten "Inneren Standards" (z.B. Palmitinsäure-Methylester bei der von LANGENBECK beschriebenen Methode) zeigten sämtliche Verfahren eine gute Reproduzierbarkeit, die relative Standardabweichung betrug ca. $\pm 2\%$ in Konzentrationsbereichen von 1 - 20 μg Benzoe- bzw. Hippursäure/ml biologischer Flüssigkeit.

CHALMERS und WATTS wie auch WAN und RIEGELMAN arbeiteten mit NO-Bi-(trimethylsilyl) acetamid (BSA) bzw. Bi-(trimethylsilyl) trifluoroacetamid zur Bildung von Trimethylsilyl-Estern mit oben genannten Säuren. Unter Verwendung eines "Inneren Standards" (z.B. Diäthyl-Malonat bei WAN) betrug der Variationskoeffizient bei einem Konzentrationsbereich von weniger als 10 μg Benzoe- bzw. Hippursäure/ml Urin bzw. Plasma weniger als $\pm 3\%$.

Sämtliche 7 oben beschriebene gaschromatographische Verfahren wurden unter Verwendung eines Flammen-Ionisations-Detektors (FID) ausgeführt. Im Gegensatz zu vielen anderen Autoren verzichteten CHALMERS und WATTS wie auch LANGENBECK und SEEGMILLER auf die allgemein übliche Vorreinigung des Urins mittels Essigsäure-Äthylester/Äther-Extraktion und arbeiteten mit der von JAAKONMAKI und KNOX (44) entwickelten Vorbehandlung des Urins mittels eines schwachen Anion-Austauschers. Die Recovery soll über 90 % betragen.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte UV-spektraldensitometrische Verfahren stützt sich auf die von TEUCHY und VAN SUMERE (100) entwickelte Methodik.

Das Verfahren setzt sich aus Essigsäure-Äthylester/Äther-Extraktion, dünn-schichtchromatographischer Trennung des Extraktes durch das Fließmittel Toluol/Ameisensäure-Äthylester/Ameisensäure (5/4/1, v/v) und der UV-spektraldensitometrischen Direktauswertung des Chromatogrammes zusammen.

Mit einer Empfindlichkeit von ca. 9 µg für Benzoesäure bzw. 0,2 µg für Hippursäure, einer Wiederfindungsrate von über 90 % für beide Säuren in einer Urinprobe und einem Variationskoeffizienten, der bei einer Reihenanalyse für mit Benzoesäure versetztem Urin (Konz. = 20 µg/ml) unter 8 % lag, ist diese Methodik nicht-gaschromatographischen Techniken in bezug auf Empfindlichkeit, Recovery, Exaktheit und Schnelligkeit überlegen und erfüllt somit in vielen Belangen die gestellten Forderungen. Insbesondere die spektraldensitometrische Direktauswertung von Hippur- bzw. Benzoesäure ist bisher nicht beschrieben worden. Es handelt sich hierbei um ein einfaches und wenig Zeit in Anspruch nehmendes Verfahren und läßt sich ohne großen apparativen Aufwand in jedem klinischen Labor durchführen. Von Nachteil sind die geringe Recovery extrahierter Plasmaproben und die Tatsache, daß eine Simultanbestimmung von Hippur- und Benzoesäure in einem Arbeitsgang nicht möglich sind. Trotz dieser Einschränkungen spricht nichts gegen einen routinemäßigen Einsatz im klinischen Betrieb.

Die entwickelte gaschromatographische Technik ist den meisten in der Literatur beschriebenen gaschromatographischen Verfahren unterlegen, da eine quantitative Bestimmung von Hippursäure nicht möglich ist.

Die durchschnittliche Wiederfindungsrate für mit Benzoesäure versetzte Urinproben (20 µg/ml) liegt bei 92 %, die Standard-

abweichung beträgt ca. $\pm 1,8 \mu\text{g}$, die Mindestnachweisgrenze für Benzoesäure liegt in einem Konzentrationsbereich von ca. $2 \mu\text{g/ml}$.

Die Modifikationen des von SINHA und GABRIELI (91) beschriebenen säulenchromatographischen Verfahrens mittels Sephadex G-10 sind, um ihre Anwendbarkeit im oben genannten Konzentrationsbereich von $5 - 50 \mu\text{g/ml}$ zu ermöglichen, mit einem solchen Mehraufwand an Arbeit und Zeit verbunden, daß ein Einsatz im klinischen Labor nicht gerechtfertigt wäre. Die Ergebnisse der nicht modifizierten Methodik sind lediglich halbquantitativ verwertbar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der quantitativen Bestimmung von Benzoe- bzw. Hippursäure in Urin und Blutplasma in einem Konzentrationsbereich von 5 - 50 µg/ml.

Hierzu bediente man sich dreier verschiedener chromatographischer Verfahren, einer dünnschichtchromatographisch-spektraldensitometrischen Technik, einer gaschromatographischen Analyse und einer säulenchromatographisch-spektral-photometrischen Methode. Die Entwicklung dieser Verfahren, ihre potentiellen Anwendungsbereiche und Ergebnisse werden im einzelnen dargelegt.

Durch die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zur Bestimmung von Hippursäure, Benzoessäure und Benzoylglucuronid durch direkte Densitometrie auf Dünnschichtchromatogrammen gelang die Entwicklung einer neuen und zuverlässigen Analysenmethode.

In der "Einführung" dieser Arbeit werden die chemischen und pharmakodynamischen wie auch die klinischen Wirkungen und Nebenwirkungen von Benzoylperoxid dargelegt, gefolgt von einer ausführlichen Beschreibung des Metabolismus, der Pharmakokinetik und der toxischen Eigenschaften resorbierter Benzoessäure, dem Stoffwechselprodukt perkutan applizierten Benzoylperoxids.

Im Rahmen der "Diskussion" erfolgt eine Zusammenstellung und kritische Beurteilung bisher veröffentlichter Analysenmethoden zur Bestimmung von Hippursäure und Benzoessäure in biologischen Flüssigkeiten.

6 TABELLEN

Tabelle 1 (Recovery-Versuche bezüglich der Extraktion)

Urinproben (10 Proben)

19239 cpm	$\bar{A}$	100 %
16833 cpm	$\bar{A}$	87,5 %
17674 cpm	$\bar{A}$	91,9 %
17995 cpm	$\bar{A}$	93,5 %
19521 cpm	$\bar{A}$	101,5 %
20201 cpm	$\bar{A}$	105,0 %
16256 cpm	$\bar{A}$	84,5 %
17402 cpm	$\bar{A}$	90,5 %
18796 cpm	$\bar{A}$	97,7 %
19133 cpm	$\bar{A}$	99,4 %
17678 cpm	$\bar{A}$	91,9 %

Durchschnitt:

18148,9 cpm/Probe $\bar{A}$ 94,3 %

Plasmaproben (10 Proben)

19239 cpm	$\bar{A}$	100 %
12627 cpm	$\bar{A}$	65,6 %
14292 cpm	$\bar{A}$	74,3 %
12291 cpm	$\bar{A}$	63,9 %
13738 cpm	$\bar{A}$	71,4 %
11911 cpm	$\bar{A}$	61,9 %
12549 cpm	$\bar{A}$	65,2 %
14022 cpm	$\bar{A}$	72,9 %
13801 cpm	$\bar{A}$	71,7 %
12593 cpm	$\bar{A}$	65,4 %
13418 cpm	$\bar{A}$	69,7 %

Durchschnitt:

13124,2 cpm/Probe $\bar{A}$ 68,2 %

Tabelle 2 (R_f -Werte von Benzoesäure und Hippursäure)

<u>Benzoesäure</u>		<u>Hippursäure</u>	
0,6200	<u>Durchschnitt:</u>	0,4071	<u>Durchschnitt:</u>
0,6644	<u>0,6611</u>	0,4362	<u>0,4605</u>
0,7007		0,4400	
0,6068		0,4899	
0,5862		0,4379	
0,7062		0,4452	
0,6950		0,4413	
0,6985		0,4482	
0,6736		0,4344	
0,6609		0,4362	
		0,4482	
		0,4375	
		0,4363	
		0,4545	
		0,4444	
		0,5827	
		0,5364	
		0,5333	

Tabelle 3 (Recovery und Genauigkeit der spektraldensitometrischen Methode)

Urinproben (10 Proben)

<u>20,00 µg</u>	<u>△</u>	<u>100 %</u>	
18,65 µg	△	93,25 %	<u>Durchschnitt:</u> 18,67 µg $\hat{=}$ <u>93,35 %</u>
19,30 µg	△	96,50 %	
18,95 µg	△	94,75 %	<u>Varianz:</u> V = <u>2,11 µg²</u>
19,10 µg	△	95,50 %	
17,05 µg	△	85,25 %	<u>Standardabweichung:</u> S = $\pm$ <u>1,45 µg</u>
20,10 µg	△	100,50 %	
18,61 µg	△	93,05 %	<u>Relative Standardabweichung (Va-</u>
16,14 µg	△	80,70 %	<u>riationskoeffizient):</u> $V_k = \pm$ <u>7,8 %</u>
18,44 µg	△	92,20 %	
21,35 µg	△	106,75 %	

Tabelle 4 (Recovery und Genauigkeit des gaschromatographischen Verfahrens)

Urinproben (10 Proben)

20,00 µg $\hat{=}$ 100 %

19,44 µg	$\hat{=}$	97,20 %
18,25 µg	$\hat{=}$	91,25 %
18,20 µg	$\hat{=}$	91,00 %
15,99 µg	$\hat{=}$	79,95 %
21,34 µg	$\hat{=}$	106,70 %
18,43 µg	$\hat{=}$	92,15 %
17,40 µg	$\hat{=}$	87,00 %
16,05 µg	$\hat{=}$	80,25 %
18,50 µg	$\hat{=}$	92,50 %
20,91 µg	$\hat{=}$	104,55 %

Durchschnitt: 18,45 µg $\hat{=}$ 92,26 %

Varianz: V = 3,22 µg²

Standardabweichung: S = $\pm$ 1,8 µg

Variationskoeffizient: V_k = $\pm$ 9,76 %

Plasmaproben (10 Proben)

20,00 µg $\hat{=}$ 100 %

13,82 µg	$\hat{=}$	69,10 %
14,71 µg	$\hat{=}$	73,55 %
15,63 µg	$\hat{=}$	78,15 %
12,39 µg	$\hat{=}$	61,95 %
13,68 µg	$\hat{=}$	68,40 %
14,94 µg	$\hat{=}$	74,70 %
13,60 µg	$\hat{=}$	68,00 %
11,04 µg	$\hat{=}$	55,20 %
12,87 µg	$\hat{=}$	64,35 %
13,92 µg	$\hat{=}$	69,60 %

Durchschnitt: 13,84 µg $\hat{=}$ 69,2 %

Varianz: V = 1,79 µg²

Standardabweichung: S = $\pm$ 1,34 µg

Variationskoeffizient: V_k = $\pm$ 9,68 %

Tabelle 5 (Recovery des säulenchromatographisch-spektral-
photometrischen Verfahrens)

93,9 %	}	50 µg	<u>Durchschnitt:</u> 94,55 µg $\hat{=}$ <u>94,6 %</u>	
98,6 %				
96,4 %	}	25 µg		
91,1 %				
90,2 %	}	15 µg		
97,5 %				
96,1 %	}	10 µg		
92,6 %				

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. AMSEL, L.P. & LEVY, G. (1969)
Drug biotransformation interactions in man. II:
A pharmakokinetik study of the simultaneous
conjugation of benzoic and salicylic acids
with glycine.
J. PHARM. SCI., 58, 321.
2. ANDO, T., KLINGBERG, W.G., WARD, A.N., RASMUSSEN, K. &
NYHAN, W.L. (1971)
Isovaleric acidemia presenting with altered
metabolism of glycine.
PEDIAT. RES., 5, 478.
3. ARMSTRONG, M.D., SHAW, K.N.F. & WALL, P.E. (1956)
The phenolic acids of human urine; paper
chromatography of phenolic acids
J. BIOL. CHEM., 218, 293
4. BARNES, L.A., MORROW, G., NOCHO, R.E. & MARESCA, R.A.
(1970)
Silicic acid chromatography of organic acids
in blood cells and biological fluids.
CLIN. CHEM., 16, 20.
5. BEARDMORE, T.D. & KELLEY, N.K. (1971)
Ultraviolet-absorbing compounds in urine
from patients with hereditary disorders of
purine and pyrimidine metabolism.
CLIN. CHEM., 17, 795.
6. BLAU, K. (1970)
Aromatic acid excretion in phenylketonuria.
Analysis of the unconjugated aromatic acids
derived from phenylalanine.
CLIN. CHIM. ACTA, 27, 5.
7. BRAY, H.G., THORPE, W.V. & WHITE, K. (1951)
Kinetic studies of the metabolism of foreign
organic compounds. 1) The formation of benzoic
acid from benzamide, toluene, benzyl alcohol
and benzaldehyde and its conjugation with
glycine and glucuronic acid in the rabbit.
BIOCHEM. J., 48, 88.

8. BROGDEN, R.N., SPEIGHT, T.M. & AVERY, G.S. (1974)
Benzoylperoxide acne lotions: an independent report.
NEW ETHICALS AND MEDICAL PROGRESS, 33.
9. BUNGE, G. & SCHMIEDEBERG, O. (1876 - 1877)
Arbeiten aus dem Laboratorium für experimentelle Pharmakologie zu Strassburg.
ARCH. EXP. PATHOL. PHARMAKOL., 6, 233.
10. CHALMERS, R.A. & WATTS, R.W.E. (1972)
Quantitative extraction and gas-liquid chromatographic determination of organic acids in urine.
ANALYST, 97, 958.
11. CHANTRENNE, H. (1955)
Hippuric acid synthesis.
In: S.P. COLOWICK & N.O. KAPLAN:
METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. II, 346.
(Academic Press, New York)
12. CHARRANSOL, G. & DESGREZ, P. (1970)
Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour la détermination quantitative de l'acide oxalique.
J. CHROMAT., 48, 530.
13. COLMAN, G.J. & ROENIGK, H.H. (1978)
Topical therapy of leg ulcers with 20 % benzoyl peroxide lotion.
CUTIS, 21, 491.
14. COTTERILL, J.A., (1977)
Treatment of acne vulgaris by a benzoyl peroxide gel: a controlled study.
In: MEDICAL DIGEST, Vol. XXII, No. 2
15. COWARD, R.F. & SMITH, P. (1969)
Some easily prepared urinary extracts suitable for gas chromatography.
J. CHROMAT., 39, 496.
16. CUNLIFE, W.J., DODMAN, B. & EAD, R. (1978)
Benzoyl peroxide in acne.
THE PRACTITIONER, 220, 479.

17. DAKIN, H.D. (1910)
The fate of sodium benzoate in the human organism.
J. BIOL. CHEM., 7, 103.
18. DALGLIESH, C.E., HORNING, E.C., HORNING, M.G., KNOX, K.L. & YARGER, K. (1966)
A gas-liquid chromatographic procedure for separating a wide range of metabolites occurring in urine or tissue extracts.
BIOCHEM. J., 101, 792.
19. DENIGES, G. (1940)
Sur un dosage de l'acide hippurique par colorimetrie.
BULL. TRAV. SOC. PHARM. BORDEAUX, 78, 57.
20. DICKENS, F. & PEARSON, J. (1951)
The micro-estimation of benzoic and hippuric acids in biological material.
BIOCHEM. J., 48, 216.
21. ELLIOT, H.C. (1957)
Microdetermination of hippuric acid in urine.
ANAL. CHEM., 29, 1712.
22. ELLMAN, G.L., BURKHALTER, A. & LA DOU, J. (1961)
A fluorometric method for the determination of hippuric acid.
J. LAB. CLIN. MED., 57, 813.
23. FANTA, D., BARDACH, H. & JURECKA, W. (1977)
Klinische Erfahrungen mit Benzoylperoxid in der Behandlung der Acne vulgaris.
WIENER KLIN. WOCHENSCHRIFT, 22, 748.
24. FEIGL, F., GOLDSTEIN, D. & HAGUENAUER-CASTRO, D. (1960/61)
Detection of hippuric acid and derivatives through pyrolytic formation of glycine.
Z. ANAL. CHEM., 178, 419.
25. FLEK, J. & SEDIVEC, V. (1971)
Bestimmung toxischer Substanzen und ihrer Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten mittels Gaschromatographie.
VI: Benzoesäure im Urin.
COLLECTION CZECHOSLOV. CHEM. COMMUN., 36, 3108.

26. FLEK, J. & SEDIVÉC, V. (1971)
Benzoic acid in the urine of persons
exposed to toluene vapours.
PRAC. LEK., 23, 309.
27. FOLIN, O. & FLANDERS, F.F. (1912)
A new method for the determination
of hippuric acid in urine.
J. BIOL. CHEM., 11, 257.
28. FULTON, J.E., FARZAD-BAKSHANDEH, A. & BRADLEY, S.
(1974)
The mechanism of benzoylperoxide in acne
and the use with topical vitamin A acid.
J. CUT. PATH., 1, 191.
29. FULTON, J.E., (1975)
Acne vulgaris..
CURRENT THERAPY, SAUNDERS PHILADELPHIA/USA
30. GAFFNEY, G.W., SCHEIER, K., DIFERRANTE, N. &
ALTMAN, K. (1954)
The quantitative determination of hippuric
acid.
J. BIOL. CHEM., 206, 695.
31. GLOOR, M., HUMMEL, A. & FRIEDERICH, H.C. (1975)
Experimentelle Untersuchungen zur Benzoyl-
peroxidtherapie der Acne vulgaris.
ZEITSCHRIFT FÜR HAUTKRANKHEITEN, 50, 657.
32. GRIFFITH, W.H. (1926)
Benzoylated amino acids in the animal organism.
J. BIOL. CHEM., 69, 197.
33. GRIFFITH, W.H. (1929)
Benzoylated amino acids in the animal organism.
V: The synthesis of glycine and of hippuric
acid in rats.
J. BIOL. CHEM., 85, 751.
34. HAMMOND, K.B. & GOODMAN, S.I. (1970)
A gas chromatographic procedure for detection
of pathological organic aciduria.
CLIN. CHEM., 16, 212.

35. HARE, P.J. (1975)
Benzoyl peroxide gel compared with retinoic acid in acne vulgaris.
BRIT. J. CLIN. PRACTICE, 29, 63.
36. van der HEIDEN, C., WADMAN, S.K., KETTING, D. & de BREE, P.K. (1971)
Urinary and faecal excretion of metabolites of tyrosine and phenylalanine in a patient with cystic fibrosis and severely impaired amino acid absorption.
CLIN. CHIM. ACTA, 31, 133.
37. van der HEIDEN, C., WAUTERS, E.A.K., KETTING, D., DURAN, M. & WADMAN, S.K. (1971)
Gas chromatographic analysis of urinary tyrosine and phenylalanine metabolites in patients with gastrointestinal disorders.
CLIN. CHIM. ACTA, 34, 289.
38. HOLZMAN, H., MORSCHES, B. & BENES, P. (1979)
Zur Resorption von Benzoylperoxid. Eine Studie an 20 Patienten mit Ulcera crurum.
Persönliche Mitteilungen.
39. HÜLSMANN, W.C. & STATIUS van EPS, L.W. (1967)
The metabolism of p-aminohippuric acid and p-acetylaminohippuric acid.
CLIN. CHIM. ACTA, 15, 233.
40. HUNZIKER, N., FELDMANN, R.J. & MAIBACH, H. (1978)
Animal models of percutaneous penetration: comparison between mexican hairless dog and man.
DERMATOLOGICA, 156, 79.
41. HURWITZ, S. (1976)
Acne vulgaris.
PEDIAT. DERMAT., 50, 772.
42. IKEDA, M. & OHTSUJI, H. (1969)
Hippuric acid, phenol and trichloroacetic acid levels in the urine of japanese subjects with no known exposure to organic solvents.
BRIT. J. IND. MED., 26, 162.

43. IKEDA, M. & OHTSUJI, H. (1969)
Significance of urinary hippuric acid determination as an index of toluene exposure.
BRIT. J. IND. MED., 26, 244.
44. JAAKONMAKI, P.I., KNOX, K.L., HORNING, E.C. & HORNING, M.G. (1967)
The characterization by gas-liquid chromatography of ethyl β -D-glucosiduronic acid as a metabolite of ethanol in rat and man.
EUR. J. PHARMACOL., 1, 63.
45. JAMES, S.P., WARING, H.R. & WHITE, D.A. (1967)
Separation of mercapturic acids and related compounds by gas chromatography and a method for the determination of hippuric acid.
J. CHROMAT., 26, 255.
46. JANSSEN, L. & SAMUELSON, O. (1971)
Separation of dicarboxylic hydroxy acids by anion-exchange chromatography and gas chromatography.
J. CHROMAT., 57, 353.
47. JELLUM, E., STOKKE, O. & ELDJARN, L. (1971)
Screening for metabolic disorders using gas-liquid chromatography, mass spectrometry and computer technique.
SCAND. J. CLIN. LAB. INVEST., 27, 273.
48. JOLLEY, R.L. & SCOTT, C.D. (1970)
Preliminary results from high-resolution analyses of ultraviolet-absorbing and carbohydrate constituents in several pathologic body fluids.
CLIN. CHEM., 16, 687.
49. KEHL, H. (1967)
Hippuric acid analysis of urine using the Hofmann rearrangement.
CLIN. CHEM., 13, 475.
50. KELLER, W. (1842)
Über Verwandlung der Benzoesäure in Hippursäure.
JUSTUS LIEBIGS ANN. CHEM., 43, 108.

51. KIELLEY, R.K. & SCHNEIDER, W.C. (1950)
Synthesis of p-aminohippuric acid by
mitochondria of mouse liver homogenates.
J. BIOL. CHEM., 185, 869.
52. KINGSBURY, F.B. & SWANSON, W.W. (1921)
A rapid method for the determination
of hippuric acid in urine.
J. BIOL. CHEM., 48, 13.
53. KLIGMAN, A.M., LEYDEN, J.J. & STEWART, R. (1977)
New uses for benzoyl peroxide:
a broad-spectrum antimicrobial agent.
INTERNAT. J. DERMAT., 16, 413.
54. LANGENBECK, U. & SEEGMILLER, J.E. (1973)
Gas chromatography-mass spectrometry studies
of hippuric-acid derivatives. I: Evaluation
of methods for quantitative determination
of hippuric acid. Search for benzoylsar-
cosine excretion in normal urine.
J. CHROMAT., 80, 81.
55. LEUTHARDT, F. & NIELSEN, H. (1951)
Recherches sur la synthèse biologique
de l'acide hippurique.
HELV. CHIM. ACTA, 34, 1618.
56. LIDDELL, K. (1974)
Benzoyl peroxide gel in the treatment
of acne vulgaris.
BRIT. J. CLIN. PRACT., 28, 379.
57. LOEVENHART, A.S. (1905)
Benzoylsuperoxid, ein neues therapeu-
tisches Agens.
THERAPEUT. MONATSHFTE, 19, 426.
58. LYNCH, W.S. & BAILIN, P.L. (1978)
The promotion of wound healing following
chemosurgery (Mohs' Technique) by dressing
with a lotion of benzoyl peroxide.
J. DERMAT. SURG. & ONCOL., 4, 91.

59. LYON, R.F. (1973)
Action of benzoyl peroxide.
PERSÖNLICHE MITTEILUNG.
60. MASRY, A.M.EL, SMITH, J.N. & WILLIAMS, R.T. (1956)
Studies in detoxication. 69. The metabolism of alkylbenzenes: n-propylbenzene and n-butylbenzene with further observations on ethylbenzene.
BIOCHEM. J., 64, 50.
61. MEIGEL, W.N. & PRÜCKNER, H. (1977)
Therapie der Akne vulgaris mit Panoxyl
ZEITSCHR. f. HAUTKRANKH., 52, 725.
62. MORDEN, B. & BAYNE, R. (1976)
Prevention, assessment and treatment of decubitus ulcers.
CANAD. FAM. PHYSICIAN, 22, 1301.
63. MORLEY, M.H. (1973)
Decubitus ulcer management - a team approach.
CANAD. NURSE
64. NAGANO, T. & OGIJA, S. (1964)
New colorimetric method of hippuric acid in liver-function test.
TOHOKU YAKKA DAIGAKU KENKYU NEMPO, 11, 29.
65. NGUYEN, L.Q. & WEINER J. (1977)
Treatment of pyoderma gangrenosum with benzoyl peroxide.
CUTIS, 19, 842.
66. OGATA, M., TAKATSUKA, Y. & TOMOKUNI, K. (1971)
Excretion of hippuric acid and m-or p-methyl-hippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and m-or p-xylene in an exposure chamber and in workshops, with specific reference to repeated exposures.
BRIT. J. IND. MED., 28, 382.
67. PACE, W.E. (1965)
A benzoyl peroxide sulfur cream for acne vulgaris.
CANAD. MED. ASS. J., 93, 252.

68. PACE, W.E. (1976)
Treatment of cutaneous ulcers with
benzoyl peroxide.
CANAD. MED. ASS. J., 115, 1101.
69. PERRY, T.L., HANSEN, S., DIAMOND, S., MELANCON, S.B. &
LESK, D. (1971)
Acetic and benzoic acids in the urine of
patients with chronic schizophrenia.
CLIN. CHIM. ACTA, 31, 181.
70. PERSKY, H., GAMM, S.R. & GRINKER, R.R. (1952)
Correlation between fluctuation of free
anxiety and quantity of hippuric acid
excretion.
PSYCHOSOM. MED., 14, 34.
71. PLEWIG, G. (1975)
Therapie der Akne.
THERAPIEWOCHE, 25, 2810.
72. QUICK, A.J. (1926)
The study of benzoic acid conjugation
in the dog with a direct quantitative
method for hippuric acid.
J. BIOL. CHEM., 67, 477.
73. QUICK, A.J. (1931)
The conjugation of benzoic acid in man.
J. BIOL. CHEM., 92, 65.
74. QUICK, A.J. (1932)
The site of the synthesis of hippuric acid
and phenylacetic acid in the dog.
J. BIOL. CHEM., 96, 73.
75. QUICK, A.J. (1933)
The synthesis of hippuric acid: a new test
of liver function.
AM. J. MED. SCI., 185, 630.
76. QUICK, A.J. (1940)
The clinical application of the hippuric
acid - and the Prothrombin tests.
AM. J. CLIN. PATHOL., 10, 222.

77. QUICK, A.J. (1940)
The hippuric acid test as a means for
determining hepatic function.
ACTA MED. SCAND., 104, 216.
78. RADICS-AJTEI, I. & ARATO, E.S. (1965)
Determination of hippuric acid and free
benzoic acid in urine.
MUNKAVEDELEM, 11, 32.
79. RIEDER, H.P. (1957)
Bestimmung von Benzoesäure neben Hippur-
säure mit Hilfe einer differential-spek-
trophotometrischen Methode.
CLIN. CHIM. ACTA, 2, 497.
80. ROBINSON, D., SMITH, J.N. & WILLIAMS, R.T. (1955)
Studies in detoxication: 60) The metabolism
of alkylbenzenes. Isopropylbenzene (Cumene)
and derivatives of hydratropic acid.
BIOCHEM. J., 59, 153.
81. ROBINSON, D. & WILLIAMS, R.T. (1955)
Studies in detoxication: 61) The metabolism
of alkylbenzenes. Tert.-butylbenzene.
BIOCHEM. J., 59, 159.
82. ROSEVEAR, J.W., PFAFF, K.J. & MOFFITT, E.A. (1971)
High-resolution chromatographic system for
measuring organic acids in biological samples.
CLIN. CHEM., 17, 721.
83. SCHACHTER, D. & TAGGART, J.V. (1953)
Benzoyl coenzyme A and hippurate synthesis.
J. BIOL. CHEM., 203, 925.
84. SCHACHTER, D. & TAGGART, J.V. (1954)
Glycine n-acylase: Purification and properties.
J. BIOL. CHEM., 208, 263.
85. SCHACHTER, D. (1956)
The chemical estimation of acyl glucuronides
and its application to studies on the meta-
bolism of benzoate and salicylate in man.
J. CLIN. INVEST., 36, 297.

86. SCOTT, C.D., ATTRILL, J.E. & ANDERSON, N.G. (1967)
Automatic, high-resolution analysis of
urine for its ultraviolet-absorbing
constituents.
PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 125, 181.
87. SCOTT, C.D. (1968)
Analysis of urine for its ultraviolet-
absorbing constituents by high-pressure
anion-exchange chromatography.
CLIN. CHEM., 14, 521.
88. SHARRATT, M., FRAZER, A.C. & FORBES, O.C. (1964)
Study of the biological effects of benzoyl
peroxide.
FOOD AND COSMETICS TOXICOLOGY, 2, 527.
89. SHATALOVA, A.A. & MEEROV, G.I. (1961)
Quantitative radiometric method for the
determination of hippuric acid in urine.
BIOKHEMIYA, 26, 444.
90. SHERLOCK, S. (1946)
Hippuric acid synthesis-test of liver
function.
LANCET, 1, 159.
91. SINHA, S.N. & GABRIELI, E.R. (1968)
Simple method for simultaneous determi-
nation of benzoic and hippuric acids in
biological fluids.
CLIN. CHIM. ACTA, 19, 313.
92. SINSHEIMER, J.E. & BREAUULT, G.O. (1971)
Chromatographic determination of benzoic
acid derivatives (in urine) for application
to metabolism studies.
J. PHARM. SCI., 60, 255.
93. SMITH, J.N., SMITHIES, R.H. & WILLIAMS, R.T. (1954)
Studies in detoxication. 59) The metabolism
of alkylbenzenes. The biological reduction
of ketones derived from alkylbenzenes.
BIOCHEM. J., 57, 74.

94. SMITH, J.N., SMITHIES, R.H. & WILLIAMS, R.T. (1954)
Studies in detoxication: 55) The metabolism of alkylbenzenes. a) Glucuronic acid excretion following the administration of alkylbenzenes. b) Elimination of toluene in the expired air of rabbits.
BIOCHEM. J., 56, 317.
95. SMITH, J.N., SMITHIES, R.H. & WILLIAMS, R.T. (1954)
Studies in detoxication: 56) The metabolism of alkylbenzenes. Stereochemical aspects of the biological hydroxylation of ethylbenzene to methylphenylcarbinol.
BIOCHEM. J., 56, 320.
96. SOETBEER, F. (1902)
Kontrolle der Blumenthal'schen Methode der Hippursäurebestimmung.
HOPPE SEYLER ZTSCHR. PHYSIOL. CHEM., 35, 536.
97. van SUMERE, C.F., TEUCHY, H., PE, H. VERBEKE, R. & BEKAERT, J. (1969)
Quantitative investigation on the hippuric acid formation in healthy and diseased individuals.
CLIN. CHIM. ACTA, 26, 85.
98. SWEETLEY, C.C. & WILLIAMS, C.M. (1961)
Microanalytical determination of urinary aromatic acids by gas chromatography.
ANAL. BIOCHEM., 2, 83.
99. TEMPLE, A.R., CLEMENT, M.S. & DONE, A.K. (1968)
Studies of glucuronidation. IV: Evidences of different processes for o-aminophenol and p-nitrophenol.
PROC. SOC. EXPTL. BIOL. MED., 128, 307.
100. TEUCHY, H. & van SUMERE, C.F. (1969)
Quantitative thin-layer chromatographic determination of hippuric acid in rat urine.
CLIN. CHIM. ACTA, 25, 79.
101. TOMLINSON, G.A. & YAFFEE, S.J. (1966)
The formation of bilirubin and p-nitrophenol glucuronides by rabbit liver.
BIOCHEM. J., 99, 507.

102. TUBIS, M., BLAHD, W.H., ENDOW, J.S. & RAWALAY, S.S. (1964)
The metabolism of ortho-¹³¹J-jodobenzoic acid.
I) Its use as a possible liver function test.
J. NUCLEAR MED., 5, 532.
103. TWITCHETT, P.J., GERVIN, A.E.P., MOFFAT, A.C., WILLIAMS, P.L. & SULLIVAN, A.T. (1976)
An evaluation of some HPLC columns for the identification and quantitation of drugs and metabolites.
In: DIXON, P., FREDERICK, P. & al. ed.: HPLC IN CLINICAL CHEMISTRY. LONDON, ACADEMIC PRESS, QD 79, 201.
104. UMBERGER, C.J. & FIORESE, F.F. (1963)
Colorimetric method for hippuric acid.
CLIN. CHEM., 9, 91.
105. VASARINSH, P. (1969)
Benzoyl peroxide-sulfur lotion in acne vulgaris - a controlled study.
CUTIS, 5, 65.
106. Vavich, J.M. & HOWELL, R.R. (1971)
Rapid identification and quantitation of urinary metabolites of phenylalanine in phenylketonuria by gas chromatography.
J. LAB. CLIN. MED., 77, 159.
107. WAN, S.H. & RIEGELMAN, S. (1972)
Renal contribution to over-all metabolism of drugs. I) Conversion of benzoic acid into hippuric acid.
J. PHARM. SCI., 61, 1278.
108. WEBB, R.E., SHAH, E. & STOKSTAD, E.L.R. (1966)
Effect of folic acid and vitamin B₁₂ on excretion of hippuric acid and formiminoglutamic acid.
PROC. SOC. EXPTL. BIOL. MED., 121, 19.
109. WEICHSELBAUM, T.E. & PROBSTEIN, J.G. (1939)
Determination of hippuric acid in urine.
J. LAB. CLIN. MED., 24, 636.

110. WESTER, R.C. & MAIBACH, H. (1976)
Relationship of topical and percutaneous
absorption in rhesus-monkey and man.
J. INVEST. DERM., 67, 518.
111. WILLIAMS, R.T. (1959)
The metabolism of aromatic acids (Chapter 11)
In: "DETOXICATION MECHANISMS",
CHAPMAN & HALL, LTD., LONDON.
112. WILLIAMS, C.M. & SWEETLEY, C.C. (1961)
A new method for the determination of urinary
aromatic acids by gas chromatography.
J. CLIN. ENDOKRINOL. METABOL., 21, 1500.
113. WILLIAMS, C.M. (1962)
Gas chromatography of urinary aromatic
acids.
ANAL. BIOCHEM., 4, 423.
114. WHO (1974)
Antimicrobials, benzoic acid and its potassium
and sodium salts.
In: Toxicological evaluation of some food
additives including anticaking agents,
antimicrobials, antioxidants, emulsifiers
and thickening agents.
FAO NUTRITION MEETINGS REPORT SERIES, 53 A, 34.
WHO FOOD ADDITIVES SERIES, 5.
115. WU, H. & WU, D.Y. (1952)
Determination of hippuric acid in normal
urine-a study in differential extraction.
FED. PROC., 11, 314.
116. WU, H. & ELLIOTT, H.C. (1961)
Urinary excretion of hippuric acid by man.
J. APPL. PHYSIOL., 16, 553.
117. YOUNG, D.S. (1970)
Effect of a chemically defined diet on
urinary excretion of minerals and
aromatic compounds.
CLIN. CHEM., 16, 681.

118. ZAURA, D.S. & METCOFF, J. (1969)
Quantification of seven tricarboxylic acid cycle and related acids in human urine by gas-liquid chromatography. ANAL. CHEM., 41, 1781.
119. ZIEVE, L., HILL, E. & NESBITT, S. (1950)
Studies of liver function tests.
I) A combined intravenous bromsulphalein-hippuric acid-galactose test. J. LAB. CLIN. MED., 36, 705.
120. ZIEVE, L. & HANSON, M. (1953)
Studies of liver function tests.
IV) Effect of repeated injections of sodium benzoate on the formation of hippuric acid in patients with liver disease. J. LAB. CLIN. MED., 42, 872.

Herrn Professor Dr.rer.nat. Bernhard Morsches, Professor an der Universitäts-Hautklinik Mainz, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, die wertvollen Rat-schläge und Diskussionen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. K. Bork danke ich für die Erstellung des zweiten Gutachtens.

Herrn Dr.rer.nat. Peter Benes möchte ich meinen Dank aus-sprechen für die ständige Hilfe und engagiert-fachliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 3.12.1955 als Sohn des Postoberamtsrats Ernst Swars und seiner Ehefrau Annemarie geb. Knizek in Trier geboren.

Von 1962 bis 1966 besuchte ich in Darmstadt die Volksschule und anschließend die Georg Büchner-Schule, ein Darmstädter Gymnasium, an dem ich im Mai 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1974/75 begann ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz mit dem Medizinstudium. Dort bestand ich im August 1976 die Ärztliche Vorprüfung, im August 1977 den 1. Abschnitt und im August 1979 den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Von Oktober 1979 bis Oktober 1980 absolvierte ich das Praktische Jahr im Stadtkrankenhaus Rüsselsheim, einem Akademischen Lehrkrankenhaus der Johannes Gutenberg-Universität. Im Oktober 1980 wurde mir nach Bestehen des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung die Approbation als Arzt erteilt.

Seit Dezember 1980 leiste ich meinen Grundwehrdienst als Stabsarzt bei der Bundesmarine ab.

